



Universitat de les Illes Balears

Dinàmica espaciotemporal de comunitats bacterianes marines en relació a l'ús del litoral a l'illa de Mallorca

Maria del Mar Aguiló Ferretjans
TESI DOCTORAL

Directors de Tesi:

Dra. Balbina Nogales Fernández

Dr. Rafael Bosch Zaragoza

Microbiologia. Departament de Biologia
Universitat de les Illes Balears



Universitat de les Illes Balears

Dinàmica espaciotemporal de comunitats bacterianes marines en relació a l'ús del litoral a l'illa de Mallorca

Tesi Doctoral presentada per Maria del Mar Aguiló Ferretjans
per a optar al títol de
Doctora en Biologia de la Universitat de les Illes Balears,
sota la direcció dels Drs. Balbina Nogales i Rafael Bosch

Directors de Tesi

Doctoranda

Dra. Balbina Nogales

Dr. Rafael Bosch

Maria del Mar Aguiló Ferretjans

Palma, Maig 2009

Ha arribat el moment més important d'aquesta tesi: els agraïments. Evidentment tots els treballs són el resultat d'un conjunt d'esforços de molta gent, però aquesta tesi en particular no hagués arribat fins aquí sense el recolzament, ànims, paciència i inestimable ajuda dels que aquí mencionaré.

La meva carrera investigadora s'inicià gràcies a en Maurici Ruiz, pràcticament sense que ell ni jo ho intuïssim, donant-me un lloc al seu laboratori de SIG i presentant-me al qui seria un dels meus directors de tesi: en Rafel Bosch, qui amb el seu entusiasme m'ha fet gaudir del món de la microbiologia i del que es pot extreure d'ella. Poc després aparegué la meva gran mestra, Balbina Nogales, de la que esper haver absorbit els màxims coneixements possibles. A en Jordi Lalucat, agrair-li l'oportunitat que em va donar de continuar al laboratori.

Ara em venen a la memòria molts bons records viscuts amb la gent del laboratori. Na Marga va ser l'anfitriona del grup de becaris, na Diana la que organitzava les festes més divertides. N'Aina sens dubte la meva ànima bessona, amb la qui vaig compartir moments, xerrades i moltes, moltes rialles i amb la que m'uneix una gran amistat.

Els mostrejos d'aquesta tesi no haguessin estat possibles sense la inestimable ajuda del patró, Mateu Bosch. I encara record el mostreig dels ports de Mallorca en el que amb na Cèlia acabarem cantant totes les cançons del moment.

Voldria mencionar als alicantins, Arantxa i Fernando, que a pesar de veure'ls poc, tenc molt bon record d'ells sense poder evitar un somriure.

Agrair també a na Cris, na Zoyla, na Claudia, na Magda, na Meri i na Miki el bon rollo que crearen i segueixen creant al laboratori o millor al ja grup d'amics del labo.

Na Mariana resultà un revulsiu amb la seva arribada al labo, va crear un punt d'inflexió a la meva vida científica i no tant científica, crec que no exager al dir que és una amistat per a sempre.

A fora de l'àmbit del laboratori també hi ha hagut pedestals als que a pesar d'estar al marge de la meva feina m'han recolzat en tot moment. N'Ana ha estat la més important entre elles.

Na Loli, n'Emma i n'Helena van ser fruit de la meva estància al SIG encara que després s'han convertit en grans amigues a fora.

Encara que ja en la distància, les nines de Càdis van ser el meu suport durant la carrera i els meus primers anys de retorn a Mallorca. Molt especialment a na Sonia vull agrair els seus consells i la seva gran amistat, a més de ser el meu referent durant molt de temps. Gràcies també a n'Alfonso, na Maria i n'Isa per alegrar-me els meus primers anys de carrera. I a na Jéssica per compartir tants bons moments juntes. Totes voltros, Pili, Merche, Raquel... sou part d'aquesta tesi.

I en l'actualitat les que han viscut la part més feixuga de la tesi, les meves compis de Tragsatec: na Mai, Carol, Rosa, Antònia i molt especialment a na Bea qui a més d'aguantar els meus rollos ha col·laborat amb la foto de portada.

A en Daniel agrair-li el seu punt d'ironia i es llevar ferro fàcilment a les coses i a na Juanita el seu recolzament tant a Càdis com a Mallorca.

Evidentment que els més sofrits, pacients, insistents i que han aconseguit amb molt d'esforç que arribàs aquest moment, són els meus pares, aquesta tesi és també seva.

I finalment del que més agraïda estaré tota la vida a la tesi és l'oportunitat que m'ha donat de conèixer a la persona més important de la meva vida, en Joseph, amb qui he compartit la part més meravellosa de la meva vida, però la més dura de la tesi.

A tots voltros i tota la gent que heu estat part de la meva vida i de la tesi
MOLTES, MOLTES GRÀCIES.

Al MEC i CITB per la financiació dels projectes sense la qual aquesta feina no hagués estat possible.

	Pàg.
INTRODUCCIÓ	5
1. Descripció física del sistema marí.	7
1.1. Radiació solar.	7
1.2. Temperatura de l'aigua.	7
1.3. Salinitat.	8
2. Distribució de nutrients al sistema marí.	9
3. Importància dels bacteris en els cicles biogeoquímics marins.	10
4. Característiques del mar Mediterrani.	11
5. Característiques dels sistemes costaners.	13
6. Contaminació i efectes antropogènics a la costa. El paper dels microorganismes.	14
7. La importància del desenvolupament de sistemes de gestió del litoral.	16
OBJECTIUS	19
MATERIALS I MÈTODES	25
1. Recollida de mostres.	25
1.1. Localització i descripció de les àrees de mostreig.	25
1.1.1. Port Adriano.	25
1.1.2. Port de Palma.	27
1.1.3. Pots de Mallorca.	27
1.1.4. Platja de Palma.	29
1.2. Calendari dels mostrejos realitzats en aquest estudi.	29
1.3. Sistema de recollida d'aigua.	30
2. Determinació de paràmetres físics, químics i biològics a les estacions de mostreig analitzades.	30
2.1. Determinació de compostos hidrofòbics.	30
2.2. Determinació de clorofil·la a.	30
2.3. Determinació del nombre total de cèl·lules i de cèl·lules presumptament actives.	31
3. Aplicació de Sistemes d'Informació Geogràfica.	32
4. Anàlisi molecular mitjançant polimorfismes de fragments de restricció terminals (T-RFLP).	32
4.1. Extracció de DNA total.	32

4.2. Amplificació del gen per a RNA ribosòmic 16S.	33
4.3. Purificació i digestió dels productes de PCR amplificats.	34
4.4. Separació dels fragments de restricció.	35
4.5. Processament de dades.	36
5. Anàlisi molecular de genoteques de 16S rDNA de Port Adriano.	36
5.1. Preparació i anàlisi de genoteques de 16S rDNA	36
5.1.1. Selecció de mostres.	36
5.1.2. Amplificació del gen per a RNA ribosòmic 16S.	36
5.1.3. Clonació.	36
5.1.4. Anàlisi i selecció dels clons mitjançant polimorfisme de longitud de fragments de restricció (RFLP).	37
5.1.5. Seqüenciació dels clons representatius dels diferents grups d'RFLP.	37
5.2. Anàlisi filogenètica.	38
5.3. Anàlisi mitjançant T-RFLP dels clons majoritaris.	39
6. Càlcul d'índexs de diversitat i anàlisi estadística.	39
RESULTATS	41
<u>Capítol 1: Descripció de l'entorn a Port Adriano.</u>	43
1. Paràmetres meteorològics i oceanogràfics més rellevants durant el període de mostreig.	45
2. Variacions dels paràmetres fisicoquímics determinats a les estacions de mostreig.	47
2.1. Temperatura de l'aigua del mar.	47
2.2. Variacions del pH.	47
2.3. Salinitat i conductivitat.	48
3. Variació de la concentració de compostos hidrofòbics.	50
4. Variació de paràmetres biològics determinats a les estacions de mostreig.	53
4.1. Variació de la concentració de clorofil·la <i>a</i> .	53
4.2. Determinació del nombre total de cèl·lules i de cèl·lules presumptament actives.	56
5. Correlacions entre els paràmetres fisicoquímics i biològics analitzats.	59
<u>Capítol 2: Estructura de les comunitats bacterianes a Port Adriano.</u>	63
1. Diversitat global de les comunitats microbianes analitzades.	65

2. Estudi comparatiu de la composició i estructura de les comunitats bacterianes marines estudiades mitjançant l'anàlisi de perfils de T-RFLP de 16S rDNA.	68
3. Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de 16S rDNA de mostres de Port Adriano.	73
4. Distribució espacial de poblacions bacterianes detectades a port Adriano.	78
5. Dinàmica temporal de les poblacions bacterianes predominants. Interaccions entre les abundàncies d'aquestes poblacions i els paràmetres ambientals.	81
<u>Capítol 3: Anàlisi filogenètica de les comunitats bacterianes a Port Adriano.</u>	87
1. Diversitat de les comunitats bacterianes marines a mostres d'aigua superficial de l'àrea de Port Adriano.	89
1.1. Composició de les genoteques.	89
1.2. Corbes d'abundància.	90
1.3. Índexs de diversitat.	92
1.4 Corbes d'enrariment.	92
1.5. Comparació estadística de genoteques.	93
2. Identificació de les poblacions bacterianes majoritàries a les genoteques d'aigua superficial de Port Adriano.	94
2.1. Principals grups filogenètics observats a les genoteques.	94
2.1.1. Diferències temporals entre les genoteques d'agost i de desembre.	95
2.1.2. Diferències espacials entre les estacions del port, platja i badia.	96
2.2. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades a la Classe <i>Alpha Proteobacteria</i> .	96
2.3. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades a la classe <i>Gamma Proteobacteria</i> .	101
2.4. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades al filum <i>Bacteroidetes</i> .	103
2.5. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades als fila <i>Actinobacteria</i> , <i>Cyanobacteria</i> i als cloroplasts d'algues eucariotes.	106
<u>Capítol 4: Estructura de les comunitats bacterianes a altres sistemes.</u>	109

1. Estudi de les comunitats bacterianes del Port de Palma.	111
1.1. Caracterització de l'àrea de mostreig del Port de Palma amb paràmetres ambientals.	111
1.2. Diversitat global de les comunitats bacterianes analitzades.	113
1.3. Composició de les comunitats bacterianes marines estudiades mitjançant l'anàlisi de perfils de T-RFLP de 16S rDNA a les estacions definitives del Port de Palma.	113
1.4. Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de mostres de Port de Palma.	114
2. Estudi de les comunitats bacterianes dels ports de l'illa de Mallorca.	117
2.1. Caracterització per paràmetres de diferents ports esportius ubicats al voltant de l'illa de Mallorca.	117
2.2. Diversitat global de les comunitats bacterianes analitzades a diferents ports de l'illa de Mallorca.	119
2.3. Composició de les comunitats bacterianes marines estudiades mitjançant l'anàlisi de perfils T-RFLP de 16S rDNA a diferents ports esportius de l'illa de Mallorca.	120
2.4. Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de 16S rDNA de mostres dels ports de l'illa de Mallorca.	121
3. Estudi de les comunitats bacterianes a la Platja de Palma.	124
3.1. Caracterització de l'àrea de mostreig de la Platja de Palma.	124
3.2. Diversitat global de les comunitats bacterianes analitzades.	125
3.3. Comparació de la composició de les diferents comunitats bacterianes marines estudiades mitjançant l'anàlisi de perfils de T-RFLP.	127
3.4. Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de 16S rDNA de mostres de la Platja de Palma.	131
DISCUSSIÓ	135
CONCLUSIONS	149
BIBLIOGRAFIA	153

INTRODUCCIÓ

Existeixen diversos factors que determinen les distribucions de les poblacions bacterianes dins un ecosistema marí: la temperatura de l'aigua, la salinitat, la quantitat i composició de matèria orgànica, la presència de contaminants, les aportacions de nutrients, entre d'altres. Arrel de la variació d'alguns d'aquests factors s'ha realitzat l'estudi descriptiu dels canvis poblacionals produïts en les comunitats bacterianes degut a la variabilitat espacial i estacional en una zona costanera. L'àrea escollida per a l'estudi es localitza a dins el marc del mar Mediterrani, a l'illa de Mallorca, on destaca l'afluència turística estival. Les aigües caracteritzades estan pròximes a la costa i es corresponen amb la capa més superficial, on es produeixen grans canvis deguts a l'activitat antropogènica.

1. DESCRIPCIÓ FÍSICA DEL SISTEMA MARÍ

Per a descriure la dinàmica del sistema marí cal entendre quins són els processos més determinants que actuen sobre ell. A continuació explicarem els efectes de la radiació solar, la temperatura i salinitat que afecten a qualsevol ambient marí.

1.1. Radiació solar

La radiació solar és primordial per al primer graó de la xarxa tròfica del sistema marí, la producció primària. Part de la radiació que arriba a la superfície del mar és absorbida per l'aigua transformant-se en calor i augmentant la seva temperatura, i part és absorbida pels organismes fotòtrofs durant la fotosíntesi. La irradiància és molt variable i depèn de la durada del dia, l'angle d'inclinació solar i les condicions meteorològiques. L'angle d'inclinació canvia segons la latitud, l'estació de l'any i el moment del dia en que ens trobam. En relació a la penetració de la llum, el medi marí es divideix verticalment en tres capes: a) la capa eufòtica, definida com la regió on la llum és suficient per al creixement i reproducció d'organismes fotòtrofs; b) per davall de la zona eufòtica hi ha la zona disfòtica, on la llum que hi arriba és massa tènue per la realització de la fotosíntesi neta, encara que hi podem trobar fitoplàncton provinent de la zona eufòtica, i c) la zona afòtica, és la més profunda i la més gran, aquí la llum del sol no pot ser detectada per cap sistema biològic (Lalli i Parsons, 2000).

1.2. Temperatura de l'aigua

L'aigua té un elevat calor específic, això li permet absorbir i perdre grans quantitats de calor amb petits canvis de temperatura. El sistema de pèrdua de calor

dels oceans és l'evaporació. Les zones temperades d'ambdós hemisferis presenten una mescla d'aigües subtropical i subpolar, obtenint aquí la màxima variació anual de temperatura. En general a les zones costeres les fluctuacions de la temperatura de l'aigua van parell amb les de l'aire, provocant unes variacions anuals de més de 10°C. La mescla per terbolesa produïda per vents i onatge transfereix la calor a les capes menys superficials. A baixes i mitjanes latituds aquest fenomen crea una capa superficial anomenada capa de mescla, de temperatura uniforme que pot tenir des d'uns pocs metres fins a uns centenars de metres de profunditat. Per davall de la capa de mescla, a uns 200 ó 300 metres, la temperatura comença a disminuir ràpidament fins arribar aproximadament als 1.000 m. La capa d'aigua, dins la capa de mescla, on es produeix el més accentuat gradient de temperatura es coneix com a termoclina permanent. Aquest gradient pot arribar a ser de 20°C. La termoclina permanent coincideix amb un canvi de densitat de l'aigua, entre l'aigua càlida superficial de baixa densitat i les aigües fredes subjacents de densitat major. La regió on es produeixen els majors canvis de densitat s'anomena pycnoclina i aquesta actua com a barrera en la circulació vertical de l'aigua, afectant a la distribució vertical de nutrients. Els gradients més accentuats de temperatura i densitat poden actuar de forma restrictiva en els moviments verticals dels organismes.

A més de la ja descrita termoclina permanent, a les zones de climes temperats s'estableixen les termoclines estacionals a la capa més superficial durant l'estiu. Són el resultat de l'increment de la irradiància solar que eleva les temperatures en superfície, i de la disminució dels vents. Es produeix una petita mescla per terbolesa que promou moviments descendents de calor i una estratificació tèrmica establida a les capes més superficials. Aquest fenomen dura fins a la tardor, quan les aigües superficials comencen a refredar-se i augmenten els vents, la terbolesa i mescla de les capes més superficials produeixen el trencament de la termoclina estacional (Lalli i Parsons, 2000).

1.3. Salinitat

La variabilitat de la salinitat als diferents mars i oceans va relacionada amb la distribució de les zones climàtiques. La salinitat augmenta per evaporació de les aigües superficials i disminueix per l'entrada d'aigua dolça provinent principalment per precipitacions, en forma de neu o d'aigua, o degut a les descàrregues dels rius. A elevades latituds la disminució de salinitat també es produeix pel desgel. La variabilitat de la salinitat és major en aigües superficials que en les més profundes degut a les

interaccions atmosfera-oceà. L'àrea on es produeixen les variacions més accentuades de salinitat s'anomena haloclina, aquesta àrea es troba a baixes i mitjanes latituds i s'estabilitza al final de la capa de mescla, voltant als 1.000 m. A partir d'aquesta profunditat la salinitat es manté entre els 34,5-35,0 psu ("practical salinity units") a tots els oceans. Les variacions de salinitat tant diürnes com estacionals són generalment molt petites, la variació mitjana anual a la superfície allunyada de costa a l'oceà sol ser de 0,3 psu.

2. DISTRIBUCIÓ DE NUTRIENTS AL SISTEMA MARÍ

Els principals nutrients inorgànics necessaris per al creixement i la reproducció del plàncton són el nitrogen i el fòsfor, a més d'altres nutrients inorgànics que precisen en menors quantitats com el ferro i el silici. Tots aquests nutrients són de gran importància degut a que es troben al mar en petites quantitats arribant a ser limitants. Les distribucions verticals d'aquests nutrients són molt semblants als diferents oceans, presenten baixes concentracions als primers 100-200 m i un ràpid increment a mesura que augmenta la profunditat, fins arribar a valors constants a tota la columna d'aigua subjacent. Les baixes concentracions de nutrients que es troben a les capes més superficials a tots els oceans és deguda al consum per part dels organismes fitoplanctònics, principalment en el període de primavera-tardor i menys als mesos hivernals (Nybakken, 1997). Els nutrients que no són consumits a les capes més superficials sedimenten, juntament amb restes d'organismes morts, a una profunditat on no hi arriba la llum per als processos fotosintètics. Són necessaris doncs, mecanismes que compensin les pèrdues de nutrients a les zones més il·luminades de la columna d'aigua on té lloc la producció primària, base de la cadena alimentària. Existeix un abastament mitjançant fenòmens mecànics que porten a la superfície aigües riques en nutrients, restablint la fertilitat de la zona eufòtica de la mar. L'eficiència d'aquests mecanismes depèn principalment de les condicions meteorològiques i dels moviments de la mar. A mars de clima temperat com el Mediterrani, de la primavera a la tardor part dels nutrients es traslladen a capes més profundes, i la resta es consumeixen a les capes superiors. A l'hivern a causa de la mescla de la columna d'aigua els nutrients tornen a la superfície. Als mesos de màximes temperatures les aigües estan estratificades i disminueix la disponibilitat de nutrients per damunt la termoclina; aquesta disminució únicament es pot veure interrompuda per esporàdiques entrades de nutrients, com per exemple aportaments

per rius. Després dels temporals de finals d'estiu i amb la disminució de la temperatura de l'aigua a la tardor, desapareix la termoclina i l'aigua de superfície refredada s'enfonsa per ser més densa i es veu substituïda per aigües més profundes. A l'hivern, sense barreres tèrmiques ni de densitat, la mescla de les aigües es produeix fàcilment aportant nutrients a la superfície. A la primavera degut a l'augment de la radiació solar i la disponibilitat de nutrients es produeix un increment dels organismes planctònics (Cognetti *et al.*, 2001).

3. IMPORTÀNCIA DELS BACTERIS EN ELS CICLES BIOGEOQUÍMICS MARINS

Els cicles biogeoquímics són el resultat d'un conjunt de processos biològics i químics que tenen lloc durant el reciclatge de diversos elements (principalment carboni, sofre, nitrogen, fòsfor i ferro) essencials per a la vida. El descobriment de la importància dels bacteris marins als cicles biogeoquímics com a organismes claus en la xarxa tròfica a causa de la seva capacitat regeneradora de la matèria orgànica particulada (POM), matèria orgànica dissolta (DOM) i d'altres nutrients ha desencadenat l'interès per l'estudi d'aquests processos (Fig.1). Els bacteris intervenen en els diferents cicles biogeoquímics de nitrogen, sofre, fòsfor i d'altres elements a més del cicle del carboni.

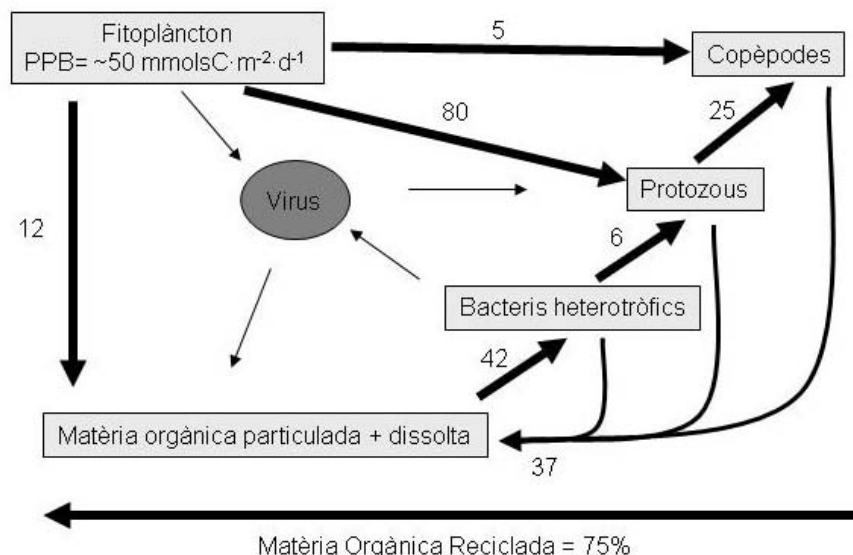


Fig.1: Xarxa tròfica de plàncton oligotròfic i l'estimació dels fluxos de matèria expressats en percentatges nets anuals de producció primària planctònica. PPB: producció primària bruta (adaptació de Nagata, 2000).

La majoria dels bacteris estan lliures i suspesos a la columna d'aigua, però alguns estan agregats a partícules. En general viuen degut a processos fotosintètics o per oxidació de la matèria orgànica dissolta o components inorgànics, utilitzant l'oxigen com acceptor d'electrons (Giovannoni i Stingl, 2005). La concentració de cèl·lules a la superfície dels oceans (0-300 m) és al voltant de 10^5 cèl·lules·ml⁻¹ i la taxa mitjana de creixement dels microorganismes és de 0,15 divisions per dia (Ducklow, 2000). Hi ha doncs, un eficient reciclatge de nutrients per a mantenir aquests ritmes de creixement a pesar de la gran competència pels escassos recursos.

El bacterioplàncton heterotròfic és el grup de consumidors de carboni orgànic dissolt (DOC) dominant a l'oceà, transformant-lo en biomassa o en nutrients inorgànics (Azam i Hodson, 1977, Azam *et al.*, 1983). Una de les entrades més importants de carboni orgànic dissolt a aigües superficials és degut a la lisi de cèl·lules fitoplanctòniques, proporcionant una ruta important de transferència de carboni a les xarxes tròfiques marines (Carlson *et al.*, 1994). La lisi cel·lular té una elevada estacionalitat al Mediterrani Occidental. Així, la mitjana de les taxes de lisi fitoplanctònica és més elevada a l'estiu que a la resta de l'any, sent especialment baixa a l'hivern (Agustí i Duarte, 2000).

4. CARACTERÍSTIQUES DEL MAR MEDITERRANI

El clima mediterrani exerceix una gran influència en les propietats bàsiques del mar Mediterrani, afectant a l'estructura i a la dinàmica del seu ecosistema. El mar Mediterrani es caracteritza per ser un mar relativament càlid i d'alta salinitat degut a l'elevada irradiància i baixes precipitacions d'aquesta zona. Les aigües del Mediterrani són pobres en nutrients; aquesta naturalesa oligotròfica es deu, en part, a la geomorfologia semitancada que presenta el Mediterrani. A través de l'Estret de Gibraltar es produeix un intercanvi d'aigua amb l'oceà Atlàntic amb entrada d'aigua atlàntica i sortida d'aigua del Mediterrani. L'aigua de l'Atlàntic és, menys densa que la del Mediterrani i aquesta diferència de densitats impedeix la mescla d'ambdues masses d'aigua. Es crea així un gradient de densitats entre l'aigua superficial atlàntica, pobra en nutrients i les aigües mediterrànies més profundes, riques en nutrients, que genera un balanç negatiu en nutrients al Mediterrani.

El mar Mediterrani consta de dues conques principals, l'occidental i l'oriental, separades pel canal de Sicília, amb diferents característiques morfològiques. Existeix un gradient de nutrients de la conca oest a l'est, incrementant-se el caràcter oligotròfic

de les aigües cap a l'est (Turley, 1999). Al mar Mediterrani desemboquen pocs rius importants, això produeix una escassa entrada de matèria orgànica per escorrentia. Les costes predominants al llarg del litoral Mediterrani són rocoses (dures i blanques), amb penya-segats que es veuen interromputs per platges arenoses.

Un dels factors més característics d'aquest mar és la temperatura superficial de l'aigua, marcada per una forta estacionalitat que ve induïda per la irradiància estival. A conseqüència d'això, es forma una forta termoclina estacional a partir de maig-juny, que es manté durant quatre o cinc mesos, fins l'arribada de les tempestes de tardor (setembre i octubre), moment en que la termoclina desapareix. D'altra banda, les masses d'aigua més superficials del Mediterrani estan molt influenciades per les pressions atmosfèriques: les elevades pressions que es produeixen a finals de l'hivern (gener i març) i a la tardor (novembre) provoquen un clima molt estable i sense níguls, augmentant la irradiància i per tant la temperatura del mar, que afavoreixen en aquestes èpoques l'aparició de proliferacions massives d'algues microscòpiques (Duarte *et al.*, 1999). A més, a l'estiu augmenta la radiació ultraviolada (290 a 400 nm) sobre la superfície de l'aigua, radiació solar que danya greument les cèl·lules i redueix les taxes de fotosíntesi, afectant també a la producció, abundància i variabilitat de les comunitats bacterianes (Chatila *et al.*, 2001). Així doncs, les elevades temperatures de l'estiu s'associen a estrès degut a l'efecte de l'excessiva irradiància, el nivell de radiacions ultraviolades i una quantitat deficient de nutrients (Agustí i Duarte, 2000).

Com ja s'ha mencionat la característica principal del sistema marí mediterrani és la seva pobresa en nutrients. A partir d'estudis d'enriquiment fets a la zona oest del Mediterrani s'ha observat que el fòsfor és el nutrient limitant per al creixement dels bacteris, principalment a aigües superficials en diferents estacions (Sala *et al.*, 2002). Una de les possibles causes de la manca de fòsfor al Mediterrani és per l'adsorció de PO_4^{3-} per Fe oxidat, molt abundant a les partícules de pols (Krom *et al.*, 1991).

La distribució dels nutrients a la part occidental del mar Mediterrani es diferencia en tres capes: la més superficial, la termoclina i la capa més profunda. Les concentracions més baixes de nutrients inorgànics dissolts es troben a la capa superficial, amb un dèficit de nitrogen en vers al fòsfor. Un excés de nitrogen en relació al fòsfor es detecta a la termoclina, mentre que a les capes més profundes hi ha un dèficit de sílice respecte al nitrogen i al fòsfor. La matèria orgànica dissolta és escassa en nitrogen i principalment en fòsfor en relació al carboni a les tres capes esmentades (Lucea *et al.*, 2003). La forta termoclina que es forma en les aigües temperades del Mediterrani limita l'aportació de nutrients des del fons marí.

El bacterioplàncton de l'oligotròfic mar Mediterrani viu dins un equilibri dinàmic on petites variacions de pressió depredadora, competició i concentracions de nutrients poden variar les comunitats que estan limitades (Sala *et al.*, 2002). Per a la descripció dels canvis que es produeixen a les àrees estudiades en aquest treball, al litoral de l'illa de Mallorca, ens centrarem en la influència de la costa i de les activitats recreatives que allí es practiquen com a possible variabilitat de l'aportament de nutrients a les capes d'aigua més superficials.

5. CARACTERÍSTIQUES DELS SISTEMES COSTANERS

La zona costanera és la que es troba entre la riba i el límit de la plataforma continental, aproximadament a uns 200 m de profunditat. No es diferencia de les aigües de mar oberta tan sols per la profunditat, sinó que tenen també una forta repercussió sobre ella les marees i l'onatge. Una altra de les característiques importants d'aquestes zones és la forta influència del litoral degut a les aportacions des de terra, que poden afectar a la química de l'aigua i variar els processos de mescla a causa de descàrregues puntuals d'aigua dolça, com a la desembocadura de rius importants. A zones caloroses, en canvi, es formen àrees properes a la costa d'elevada salinitat degut a una intensa evaporació (Dobson i Frid, 1998).

Dels processos físics mencionats els que més afecten a la costa són les marees, però degut al règim micromareal del mar Mediterrani les seves costes es veuen poc influenciades per aquest fenomen. L'onatge i els corrents són els processos físics més rellevants de la costa mediterrània. Les ones són el resultat de la transferència d'energia entre dos fluids en moviment a diferents velocitats. A la superfície del mar és l'aire el fluid de contacte amb l'aigua superficial, mentre que a més profunditat, dues masses d'aigua de característiques distintes, com per exemple la termoclina o l'haloclina poden ser causants de l'onatge (Dobson i Frid, 1998). Pel que fa als corrents superficials principals del Mediterrani, aquests es presenten a la Figura 2.

Un fenomen meteorològic habitual a les costes del Mediterrani és l'embat, un règim de vents existent durant els mesos d'estiu, la velocitat del qual no supera els 6 m·s⁻¹. Es forma a conseqüència del contrast tèrmic entre el mar i la terra, a causa de l'escalfament i refredament diürn més ràpid a la terra que al mar, generant aquest règim de vents al llarg de tota la costa. De dia la direcció dels vents és de mar a terra, mentre que a la nit és a l'inrevés.

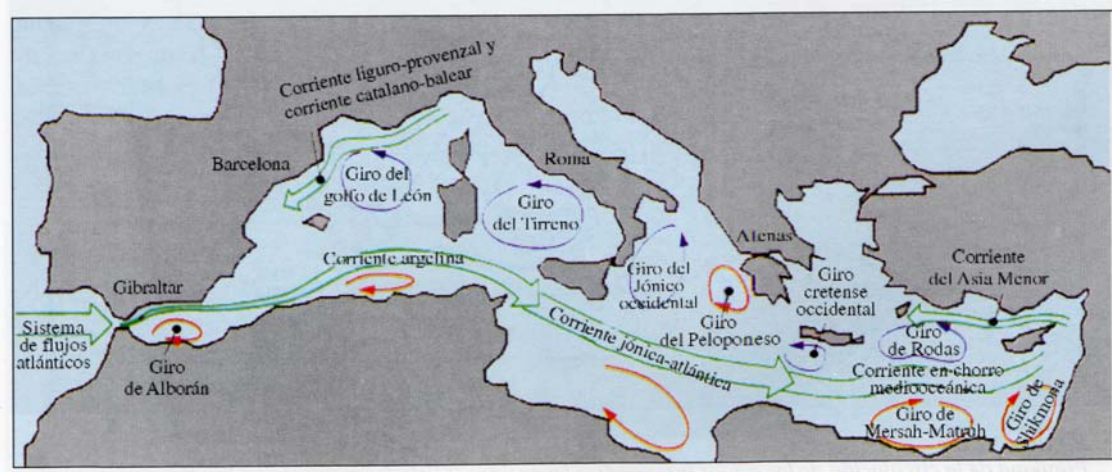


Fig.2: Corrents superficials més importants del Mediterrani (Cognetti *et al.*, 2001).

Pel que fan les diferències en les comunitats bacterianes que es poden trobar a l'oceà o a un sistema costaner, Rappé i col·laboradors (2000) conclouen que els grans grups filogenètics de bacterioplàncton detectats a diferents costes són semblants entre ells i amb els seus homòlegs a mar oberta. Al Mediterrani Occidental (Acinas *et al.*, 1997) també es detectà uniformitat horitzontal en les poblacions bacterianes, comparant zones pròximes a la costa amb zones allunyades centenars de kilòmetres. Òbviament, aquests resultats no impliquen homogeneïtat a escales més petites (centenars de metres, per exemple) ni entre grups de microorganismes concrets, així doncs, sí que es detecten importants variacions entre les diferents poblacions bacterianes. Una altra situació seria l'estudi de diferents impactes sobre la costa que provoquen canvis a les poblacions bacterianes existents. Al treball realitzat per Schauer i col·laboradors (2000), es descriuen canvis al bacterioplàncton marí de diferents zones de la costa Catalana (NO del Mediterrani) afectats per les condicions hidrogràfiques locals.

6. CONTAMINACIÓ I EFECTES ANTROPOGÈNICS A LA COSTA. EL PAPER DELS MICROORGANISMES

Considerant que l'àrea d'estudi escollida forma part d'una de les zones turístiques més importants del Mediterrani Occidental, com és l'illa de Mallorca, cal tenir en compte que a l'estiu, que és l'època de major afluència turística, aquestes costes es veuen afectades per una gran pressió antropogènica. El Mediterrani és un dels mars més afectats per aquesta pressió. El creixement de la població a la Mediterrània és exponencial i el nombre de turistes s'ha doblat cada 15 anys des de la

dècada dels 60, en previsió que es duplicarà en els pròxims 30 anys (Duarte *et al.*, 1999). L'augment de la població té conseqüències més greus, com l'augment de la demanda d'aigua potable i de les descàrregues d'aigües residuals en èpoques estivals. Així es produeixen descàrregues estacionals de nutrients al mar, quan la termoclina és més estable i quan en condicions naturals les capes més superficials d'aigua serien pobres en nutrients.

A més de les conseqüències degudes a l'increment de la població estacional que es produeix a les costes, aquestes són zones recreatives on tenen lloc diferents activitats i on es demanen diverses instal·lacions per a la seva realització. Una de les demandes més incrementades en els últims anys són els ports esportius, on l'activitat màxima anual es presenta als mesos d'estiu, per tant amb una major repercussió dels seus efectes en aquesta època. Només a l'illa de Mallorca a l'any 2001 hi havia 42 ports esportius i al 2006, 45; més de la meitat dels quals són de promoció privada i amb un nombre total d'amarradors de 14.625 al 2006 (dades extretes del Institut Balear Estadística, Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació; URL://<http://www.caib.es/ibae/xifres2007>). Els ingressos totals per turisme nàutic a les Balears van ser 328,83 milions d'euros l'any 2001 augmentant als anys posteriors fins 527 milions d'euros a l'any 2007 (dades de la Conselleria de Turisme, URL://<http://www.caib.es>). Aquest creixement està relacionat amb la demanda actual de més amarradors, dels quals a dia 30 de gener de 2008 n'hi havia 4.094 en llista d'espera (dades de Asociación de Empresas Náuticas de Baleares, URL://<http://www.aenb.es>).

Les platges també presenten aquesta elevada aflluència turística a l'estació de màximes temperatures, aportant entrada de nutrients i desestabilització de les aigües i del sediment. El nombre de pernoctacions a Mallorca durant l'any 2001 van ser 53.440.949, la més elevada dels darrers anys, mentre que les dades del 2006, les darreres de les que es disposen, són de 51.972.693 pernoctacions (URL://<http://www.caib.es/ibae/xifres2007>).

En general l'impacte humà sobre les costes del Mediterrani ha provocat un increment en les entrades de fosfats i nitrats. Els canvis en les concentracions de nutrients provoquen canvis en les comunitats planctòniques, que són la base de la cadena alimentària. Es determina doncs, que l'entrada de nutrients a causa de la superpoblació que envolta el Mediterrani és la principal força de canvis en la producció fitoplanctònica (Béthoux *et al.*, 2002). A més, aquests canvis en la comunitat fitoplanctònica provoquen canvis en la presència o absència de diferents filotips

bacterians i en l'abundància relativa dels filotips ubics. Això implica que canvis en la composició de la comunitat fitoplanctònica i altres conseqüències associades canvien la xarxa tròfica microbiana provocant diferències en la composició de les espècies bacterianes (Pinhassi *et al.*, 2004). L'efecte dels canvis o impactes a l'ecosistema marí s'exerceix immediatament a nivell dels microorganismes, però aquest nivell és el menys estudiat degut a la poca transcendència social que té en comparació als efectes sobre organismes superiors.

7. LA IMPORTÀNCIA DEL DESENVOLUPAMENT DE SISTEMES DE GESTIÓ DEL LITORAL

El litoral marí és un dels hàbitats més valuosos i més vulnerables del planeta. La majoria de les costes del món han estat o estan sent danyades per la contaminació, afectant a zones costeres comercials i a pesqueries. Per aquesta raó és primordial el control de la contaminació marina per tal de gestionar i conservar els recursos marins i costaners. Així doncs, és important conèixer les fonts de contaminació i els impactes que actuen sobre aquests ecosistemes, no tan sols per a entendre millor la seva capacitat de resposta, sinó també per a formular mesures de prevenció i de gestió del litoral (Islam i Tanaka, 2004).

Les anàlisis realitzades fins ara per a l'estudi del grau de contaminació marina han estat aplicades a les aigües de bany, per a garantir una bona qualitat d'aigua per a la salut humana. La gestió microbiològica es basa únicament en l'efecte nociu que les aigües residuals urbanes poden provocar. Per a determinar la qualitat microbiològica de les aigües de bany s'utilitzen tècniques de cultiu: es fan recomptes del nombre de coliforms totals i fecals i d'altres bacteris d'origen fecal humà. En canvi, no es considera l'efecte de l'antropogenització sobre l'estructura de les comunitats microbianes, una peça clau de la xarxa tròfica marina i un indicador del grau de degradació dels sistemes costaners.

Amb el reconeixement de la important implicació dels bacteris en els processos primaris als ecosistemes marins, s'han incrementat els esforços per a conèixer la funció dels microorganismes en els cicles biogeoquímics. Entre d'altres, les tècniques que han aconseguit aprofundir sobre aquests processos són les tècniques de biologia molecular, les quals ens permeten aplicar mètodes independents al cultiu d'organismes. Això és especialment interessant en l'estudi de bacteris marins d'aigües oligotròfiques degut al seu limitat creixement en els habituals medis de cultiu.

L'objectiu final de la utilització tant de les tècniques tradicionals com a moleculars és entendre l'estructura i funcionament dels ecosistemes naturals marins (Fig.3).

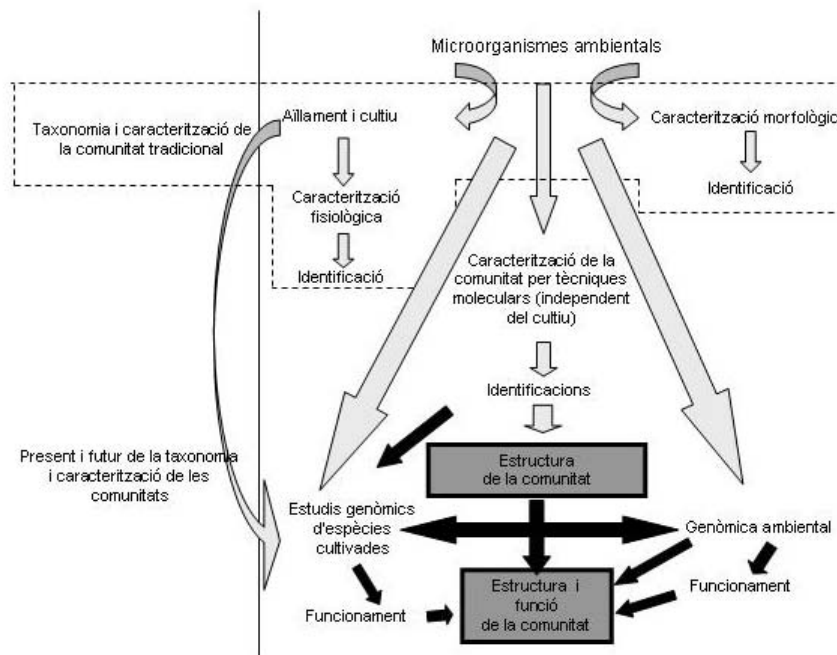


Fig.3: Esquema explicatiu de l'anàlisi de les comunitats microbianes marines mitjançant mètode molecular. Tècniques tradicionals dins el quadre de línies discontinues (modificat de Caron, 2005).

Les tècniques moleculars ens permeten al menys tres tipus d'anàlisis: a) avaluar la diversitat filogenètica a l'ecosistema; b) comparar la composició de comunitats microbianes en temps i espais determinats, podent analitzar com respon la comunitat microbiana davant canvis de factors biòtics i abiòtics i c) proporcionar una gran quantitat de informació genètica de les comunitats naturals (Caron, 2005). Per tant, l'aplicació de tècniques de biologia molecular a l'anàlisi de comunitats microbianes és una eina molt valuosa per a determinar l'estat i evolució d'aquestes comunitats en resposta a l'impacte al que estan sotmeses.

El coneixement dels canvis que es produeixen a les comunitats litorals pot ser útil per a definir microorganismes indicadors del grau d'impacte que pateix un ambient concret. Però per a una gestió eficient del litoral no és suficient amb conèixer quins microorganismes responen a l'impacte ambiental, sinó que també és important determinar l'abast espacial d'aquest impacte. Una manera de determinar això és mitjançant la utilització de tècniques del camp de la Geografia, com ara l'aplicació de Sistemes de Informació Geogràfica (SIG). Un Sistema d'Informació Geogràfica s'ha definit de moltes maneres al llarg de la seva història. De totes elles la definició més amplia i on es descriu millor la seva utilitat seria: "Conjunt d'eines dissenyades per a

reunir, introduir (a l'ordinador), emmagatzemar, recuperar, transformar i cartografiar dades espacials sobre el món real per a un conjunt particular d'objectius" (Burrough, 1988). L'aplicació de SIG facilita la comprensió de fenòmens espacials i es basa en les dades introduïdes. Aquestes dades estan formades per un suport geogràfic sobre el qual es manifesta el fenomen a estudiar i per una variable que adopti diferents modalitats a cada observació. La dada és la que fa aplicable el SIG a qualsevol disciplina (Bosque Sendra, 2000), com ara a la microbiologia ambiental.

El més innovador de les tècniques utilitzades en aquest estudi és l'englobament de dues disciplines tan dispars com la Microbiologia i la Geografia. L'aplicació de tècniques de Sistemes d'Informació Geogràfica per a la millor comprensió dels resultats obtinguts mitjançant tècniques moleculars o de determinació de paràmetres químics i biològics ens facilita en gran mesura la interpretació dels resultants donant una visió espacial molt acurada.

OBJECTIUS

1. Determinar la dinàmica bacteriana marina a la zona de mostreig de Port Adriano, on es troben àrees recreatives costaneres: un port esportiu i una petita platja.
2. Analitzar la influència de l'impacte de les àrees recreatives costaneres sobre les comunitats bacterianes i el seu abast.
3. Comparar el comportament de les comunitats bacterianes a la zona de Port Adriano amb altres ports i platges de l'illa de Mallorca.
4. Aplicar i avaluar la utilització de tècniques d'Informació geogràfica a l'estudi de les comunitats bacterianes marines com a possible eina de gestió del litoral.

MATERIALS I MÈTODES

1. RECOLLIDA DE MOSTRES

1.1. Localització i descripció de les àrees de mostreig

El treball presentat es dividirà en dues parts, una que correspon a tot l'estudi realitzat al voltant de Port Adriano i una altra on s'inclouran la resta de zones analitzades: Port de Palma, la platja de Palma i diversos ports de l'illa de Mallorca (Fig. 4).

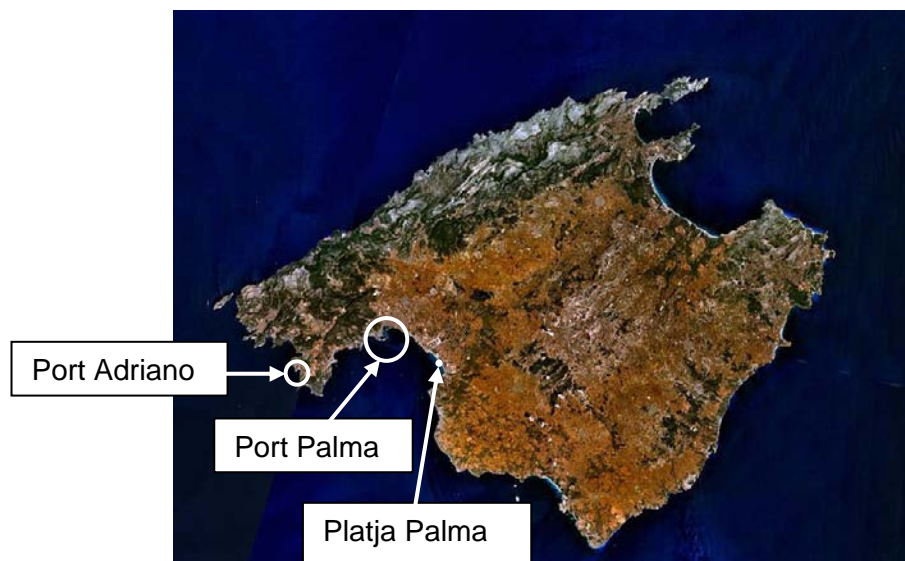


Fig.4: Localització de tres de les zones principals de mostreig d'aquest estudi (imatge Landsat).

1.1.1. Port Adriano

La zona de mostreig està situada al sud-oest de l'illa de Mallorca (Fig. 4) al municipi de Calvià. Comprèn un port esportiu, de 404 amarradors, una petita platja, Cala Penyes Rotges, declarada zona sensible de les Illes Balears (Decret 49/2003 de 9 de maig, BOIB núm. 076) i al seu voltant un conjunt d'urbanitzacions (Fig. 5). Es situaren 14 estacions de mostreig repartides per tota la zona (Taula 1), a l'interior del port (18, 17, 16), a la bocana (15 i 14), a la zona de possible influència portuària (12 i 11), a la platja (13), a prop de la costa (9, 8, 6) i allunyada d'ella (10, 7, 5), (Fig. 6).

En primer lloc es determinaren les coordenades de les estacions de mostreig i dos paràmetres geogràfics més: la distància de cada estació de mostreig a la bocana del port i la distància de cada una a la costa. La distància a la bocana es mesurà com la distància de cada estació a l'estació de mostreig número 16 (est. 16) situada al mig de l'entrada del port (Fig. 6). Es representaven les distàncies positives en direcció a

l'exterior del port i les negatives en direcció a l'interior del port. La distància respecte a la costa es mesurà des de cada estació de mostreig al punt de la costa més pròxim a aquest en línia recta. Les estacions situades a dins el port es consideraren a distància zero de la costa degut a la seva proximitat a ella en totes direccions (Taula 1). Totes les distàncies es determinaren a partir de les eines de mesura del programa Arcview 3.2. (ESRI, Estats Units). Al mostreig realitzat a Port Adriano la profunditat es mesurava mitjançant una sonda ubicada a l'embarcació. Els mostrejos es realitzaren mensualment des del maig del 2001 al juliol del 2002.



Fig. 5: Imatge de port Adriano (URL://http://www.portadriano.com).



Fig. 6: Localització de les 14 estacions de mostreig a Port Adriano (imatge Google earth).

Taula 1: Paràmetres geogràfics, coordenades, profunditat i distàncies a la costa i a la bocana, de cadascuna de les estacions de mostreig.

Estació	Coordenades		Distància bocana (m)	Distància costa (m)	Profunditat (m)
	Latitud (N)	Longitud (E)			
5	39° 29' 05"	2° 28' 16"	1156	542	22
6	39° 29' 28"	2° 28' 10"	839	50	8
7	39° 29' 28"	2° 28' 32"	363	228	10
8	39° 29' 20"	2° 28' 38'	540	70	12
9	39° 29' 08"	2° 28' 37"	902	55	12
10	39° 29' 18"	2° 28' 24"	712	401	20
11	39° 29' 35"	2° 28' 24"	502	80	7
12	39° 29' 38"	2° 28' 37"	288	39	3,6
13	39° 29' 35"	2° 28' 47"	171	50	1,2
14	39° 29' 33"	2° 28' 44"	84	53	1,4
15	39° 29' 32"	2° 28' 38"	145	20	5,5
16	39° 29' 33"	2° 28' 44'	0	0	3
17	39° 29' 26"	2° 28' 44"	-141	0	3
18	39° 29' 21"	2° 28' 44"	-293	0	2

1.1.2. Port de Palma

És el principal port de les Illes Balears, està situat al sud-oest de l'illa de Mallorca a dins de la Badia de Palma. Té 2.286 amarradors al llarg de les seves instal·lacions repartides en cinc zones: el Moll Vell, la Dàrsena de Sant Magí, la Dàrsena del Passeig Marítim, la Dàrsena de Can Barberà i el dic de l'Oest. El trànsit total de vaixells al port de Palma en el mes d'abril del 2003 va ser 499.031 vaixells i el mes de juny del mateix any de 575.547 (dades extretes de www.portsdebalears.com), ambdós mesos en els que es realitzaren els mostrejos.

Es recollí aigua a sis estacions, a dins el port (1) a la zona del Moll Vell, a la bocana (2) i les quatre restants allunyant-se del port en direcció al centre de la badia (3, 4, 5 i 6), com es pot observar a la Figura 7, on estan indicades les coordenades de cada una d'elles. Es feren dos mostrejos: el primer el mes d'abril de l'any 2003 i el segon el juny del mateix any.



Fig. 7: A: Mapa Badia de Palma, localització de les estacions de mostreig (imatge Google earth). B: Coordenades geogràfiques de les 6 estacions de mostreig del Port de Palma.

1.1.3. Ports de Mallorca

A part dels mostrejos ja mencionats, el gener de 2002 es recolliren mostres de diferents ports al voltant de l'illa de Mallorca. Els ports estudiats es localitzen al mapa de la Figura 8 i es caracteritzen a la Taula 2.

La ubicació d'aquests ports els dona característiques totalment diferents, així les dimensions de cada port permeten un determinat nombre d'amarradors i d'una mida concreta. A partir de les dades extretes de la Conselleria de Turisme (URL:<http://www.caib.es>), els ports esportius es poden classificar en dos tipus, aquells que tenen majoritàriament amarradors de petites dimensions, menors de 8 m, i els que

tenen un major nombre d'amarradors de més de 10 m. Tots els ports analitzats, excepte S'Arenal i Portals corresponen al primer tipus.

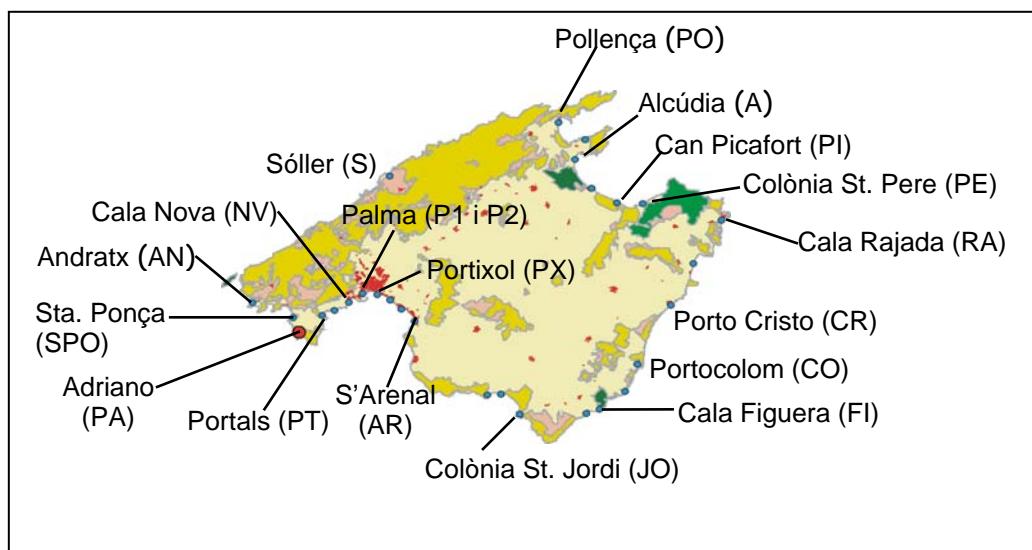


Fig. 8: Localització dels ports mostrejats el gener de 2002.

Taula 2: Nombre d'amarradors de cadascun dels ports estudiats.

Ports Nord i Est	N. amarradors	Ports Sud i Oest	N. amarradors
Sóller	183	Colònia St. Jordi	307
Pollença	375	S'Arenal	655
Alcúdia	730	Portixol	260
Can Picafort	471	Palma (1)*	-
Colònia St. Pere	307	Palma (2)	2276
Cala Rajada	130	Cala Nova	214
Porto Cristo	266	Portals	670
Portocolom	239	Sta. Ponça	526
Cala Figuera	158	Andratx	475

* L'estació de mostreig Palma 1 és d'embarcacions de pesca sense un nombre d'amarradors definit.

El mostreig a tots els ports es realitzà en un sol dia, recollírem l'aigua de la zona més estancada dels ports, és a dir, l'aigua que presentava major temps de renovació i on els corrents haurien de tenir menys influència, tal com es va fer per a la presa de la mostra a l'estació 18 de Port Adriano.

1.1.4. Platja de Palma

Situada dins la badia de Palma, té 4.600 m de longitud, una amplada mitjana de 50 m i una superfície total de 216.742 m². A causa de la seva proximitat a la ciutat de Palma ha sofert una gran urbanització (Fig. 9), per tant és considerada una platja urbana amb un elevat índex d'ocupació, principalment a l'època estival. Com a platja urbana presenta tota una sèrie d'equipaments hotelers, de seguretat i de serveis, a més d'un port esportiu de 655 amarradors.



Fig. 9 : Fotografia actual de la Platja de Palma (URL://http: www.platgesdebalears.es).

La recollida de mostres es va fer setmanalment, des de març fins desembre del 2003. En total es realitzaren 29 mostrejos. La taxa d'ocupació del 2003 a la Platja de Palma va ser del 72,9% sobre les places d'hotel disponibles, oscil·lant entre el màxim en el mes d'agost del 93,0% i el mínim en el mes de desembre del 55,5% [Dades Informatives extretes del Institut d'Estratègia Turística (INESTUR)]. A més d'aquestes dades oficials s'ha de tenir en compte que no estan comptabilitzades les afluències dels banyistes residents a Palma, que per proximitat acudeixen a aquesta platja, i els turistes no enregistrats ni a hotels ni a apartaments.

1.2. Calendari dels mostrejos realitzats en aquest estudi

A continuació es presenta, a manera de resum, les dates de les recollides de mostres, per a cadascun dels mostrejos realitzats per a aquest estudi (Fig. 10).

Any	Gener	Febrer	Març	Abril	Maig	Juny	Juliol	Ago.	Set.	Oct.	Nov.	Des.
2001					1	1	1	1	1	1	1	1
2002	1		1	1	1	1	1					
2003			4*	4	3	4	5	1	4	1	3	1

Fig. 10: Calendari de recollida de mostres. ■ Port Adriano, □ Platja de s'Arenal, ■ Port de Palma i ■ Ports de Mallorca. * Nombre de mostrejos realitzats per mes.

1.3. Sistema de recollida d'aigua

S'utilitzà el mateix sistema de recollida d'aigua per a totes les estacions i tots els mostrejos que es van realitzar. Es recollí l'aigua més superficial en dies de calma i després de dos o tres dies consecutius de mar en calma. Els mostrejos de Port Adriano i del Port de Palma es feren des d'una barca, localitzant cadascun dels punts amb un sistema de posicionament global (GPS). En canvi, els de la platja de Palma i els de Ports de Mallorca es feren des de terra. La recollida de mostres es feia al matí, entre les 8:30 i les 10:30 aproximadament, llevat de la recollida de mostres dels 18 ports que degut a la seva magnitud es realitzà fins al migdia. A cada estació es prenen mesures *in situ* de temperatura i pH i es fixava immediatament una mostra amb formaldehid (4% vol/vol concentració final) per a la realització d'hibridacions *in situ* amb sondes fluorescentes (FISH) (apartat 2.3). Les mostres d'aigua es transportaven al laboratori on es mesurava la conductivitat i salinitat, i es processaven per a la determinació de la concentració compostos hidrofòbics (apartat 2.1), clorofil·la (apartat 2.2) i per a les anàlisis moleculars (apartat 4).

2. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES FÍSICS, QUÍMICS I BIOLÒGICS A LES ESTACIONS DE MOSTREIG ANALITZADES

2.1. Determinació de compostos hidrofòbics

La determinació de compostos hidrofòbics es feia a partir de l'aigua filtrada amb dos filtres un de 5 µm i l'altra 0,22 µm, com es detalla a l'apartat 4.1, el mateix dia del mostreig. Utilitzàrem 200 ml d'aigua i realitzàrem l'extracció de compostos hidrofòbics amb tetraclorur de carboni (Panreac) (40:1 vol/vol). La fase orgànica, on queden dissolts tots els hidrocarburs de la mostra, es separava de la fase aquosa utilitzant un embut de decantació. El tetraclorur de carboni present a la fase orgànica s'evaporava a 65°C, quedant els compostos hidrofòbics com a residus sòlids. La quantitat de compostos hidrofòbics es determinà gravimètricament a una balança analítica (Mettler H51AR).

2.2. Determinació de clorofil·la a

Filtràrem 1 litre d'aigua fent servir filtres de fibra de vidre GF-F (Whatman) de 25 mm de diàmetre, els quals es guardaren congelats (-20°C) i protegits de la llum fins a l'extracció. Aquesta es realitzà amb una dissolució d'acetona saturada amb carbonat de magnesi al 90% (vol/vol). Es mesurà l'absorbància de l'extracte a 750, 664, 647 i

630 nm. Els càlculs realitzats per a conèixer la concentració de clorofil·la *a* es basaren en el mètode tricromàtic (Jeffrey i Humphrey, 1975). S'aplicà la següent fórmula:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\text{)} = \frac{(11,85 \times A_{664c} - 1,54 \times A_{647c} - 0,08 \times A_{630c}) \times V_1}{V_2 \times Z}$$

On: A_{664c} nm és el màxim d'absorció de la clorofil·la *a*; A_{647c} nm és el màxim d'absorció de la clorofil·la *b*; A_{630c} nm és el màxim d'absorció de la clorofil·la *c*; V_1 és el volum de l'extracte en mil·lilitres; V_2 és el volum de la mostra filtrada en litres i Z la longitud del pas de la llum a través de la cubeta en centímetres. Tots els valors d'absorbància es van corregir amb els valors mesurats a 750 nm.

2.3. Determinació del nombre total de cèl·lules i de cèl·lules presumptament actives

El comptatge total de cèl·lules es realitzà mitjançant tinció amb 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Porter i Feig, 1980) i observació en un microscopi d'epifluorescència Axiophot (Zeiss). A més es va fer hibridació de cèl·lules amb la sonda per 16S rRNA EUB338 específica pel domini *Bacteria* (Amann *et al.*, 1990). La sonda estava marcada a l'extrem 5' amb el fluorocrom Cy3 (Thermo Hybaid, Ulm, Alemanya).

Es fixaven les mostres d'aigua *in situ* amb 4% (v/v, de concentració final) de formaldehid i es mantenien a 4°C aproximadament 24 h. Posteriorment es filtraven 25 ml de l'aigua amb un filtre de policarbonat (mida de porus 0,2 μm ; Millipore), i es rentava dues vegades amb un tampó de fosfat salí, PBS (Sambrook *et al.*, 2001). Posteriorment els filtres s'eixugaven a l'aire i es conservaven a -20°C fins al seu processament.

La hibridació es va realitzar d'acord amb el procediment descrit per Glöckner i col·laboradors (1996). Preparàvem la mescla d'hibridació amb formamida al 35% (vol/vol, concentració final), realitzant la hibridació a 46°C durant 2 hores. Posteriorment els filtres es submergien dins una solució de rentat a 48°C durant 15 minuts. Finalment es tenyien els filtres amb DAPI (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), es rentaven amb aigua i etanol i es muntaven al portaobjectes amb Citifluor (Citifluor Ltd.). Les mostres es van observar amb un microscopi d'epifluorescència Axiophot (Zeiss).

3. APLICACIÓ DELS SISTEMES D'INFORMACIÓ GEOGRÀFICA (SIG)

En aquest estudi utilitzàrem els Sistemes d'Informació Geogràfica per tal d'extrapolar els resultats obtinguts per a diferents paràmetres a tota l'àrea de mostreig a partir d'estacions georeferenciades. D'aquesta manera es passà de tenir la informació obtinguda repartida de forma discreta al llarg de la superfície d'estudi a tenir una informació continua. A més, l'aplicació dels SIG facilità la interpretació dels resultats mitjançant la visualització a tota la zona de mostreig, i permeté comparar les diferents situacions espacials i temporals en les que ens trobam a la zona, referenciant-les amb la línia de costa.

L'aplicació dels SIG es realitzà al Servei de Sistemes d'Informació Geogràfica i Teledetecció (SSIGT) de la Universitat de les Illes Balears. El software emprat era l'Arcview 3.2 (ESRI, Estats Units), que mitjançant càlculs d'interpolació entre les dades puntuals introduïdes permetia obtenir valors interpolats a tota la superfície. Les estacions a partir de les quals realitzàrem els càlculs estaven homogèniament repartides per tota la zona, requisit indispensable per a la utilització del mètode Inverse Distance Weights [IDW, (Shepard, 1968)] que es va aplicar en aquest cas. El mètode IDW assumeix que cada valor d'un paràmetre determinat per a cadascuna de les estacions de mostreig té una influència local que va disminuint amb la distància: així el pes que s'assigna a una zona més propera a l'estació de mostreig és major que a les més allunyades. Per a la realització dels càlculs es consideraren els quatre punts de mostreig més pròxims per tal de determinar amb més precisió el valor resultant a cada localització. El programa ens permetia la introducció d'una barrera que situava els límits de càlcul d'interpolació, que en el cas d'aquest estudi corresponia a la línia de costa.

4. ANÀLISI MOLECULAR MITJANÇANT POLIMORFISMES DE FRAGMENTS DE RESTRICCIÓ TERMINALS (T-RFLP)

4.1. Extracció de DNA total

L'anàlisi molecular mitjançant T-RFLP (Liu *et al.*, 1997) s'iniciava amb la filtració de l'aigua per a fer l'extracció de DNA que es duia a terme al laboratori el mateix dia del mostreig. Es filtraven 2 litres d'aigua successivament a través d'un filtre de membrana de 5,0 µm de diàmetre de porus i a continuació a través d'un filtre de membrana de 0,22 µm de diàmetre de porus (Millipore). Es conservaren els filtres a -80°C fins a la seva utilització.

El protocol utilitzat per l'extracció de DNA és una modificació d'un protocol publicat per Nogales i col·laboradors (1999) per a extracció de DNA de sòls. L'extracció de DNA es realitzà a partir de les cèl·lules retingudes als filtres de 0,22 µm. Iniciàrem el procediment submergint el filtre amb tampó d'extracció de DNA, preparat amb Tris-HCl pH 8,0 i Na-EDTA a unes concentracions finals de 100 mM cadascun. Posteriorment afegírem lisozim a una concentració final de 3 mg·ml⁻¹ (pes/vol) i incubàrem a 37°C durant 15 minuts amb agitació (180 rpm). Passat el temps d'incubació afegírem proteïnasa K a la concentració final de 150 µg·ml⁻¹ (pes/vol) i SDS a l'1% (pes/vol) de concentració final, i incubàrem 30 minuts més en les mateixes condicions. A continuació, afegírem NaCl a 1,5 M (concentració final) i una dissolució de bromur hexadecilmetilamoni (CTAB) a una concentració final de l'1% (pes/vol) en NaCl 1,5 M de concentració final. Les mostres s'incubaren 10 minuts a 65°C. Per a assegurar el trencament de cèl·lules amb parets cel·lulars resistents es va procedir a la congelació de les mostres en nitrogen líquid i la seva descongelació a 65°C, dues vegades consecutives. Posteriorment realitzàrem dues extraccions de la fase aquosa amb un volum de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1, vol/vol/vol). El DNA que es trobava a la fase aquosa es precipitava afegint 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M (pH 4,8), 0,8 volums d'isopropanol (Panreac) i 0,01 volums de MgCl₂ 1 M; i es recollia per centrifugació durant 30 minuts a 15,700 x g. Finalment el sediment de DNA es rentava amb etanol al 70% (vol/vol), s'eixugava i es resuspenia amb 50 µl d'aigua milliQ (Millipore) autoclavada. Per comprovar el resultat de l'extracció el DNA extret s'analitzava mitjançant electroforesis en gels d'agarosa [1% pes/vol en tampó TAE (Sambrook *et al.*, 2001)], tinció amb bromur d'etidi (0,5 µg·ml⁻¹) i observació a la llum ultraviolada a un transil·luminador UPV (Rich-mond). Els extractes de DNA es conservaven a -80°C.

4.2. Amplificació del gen per a RNA ribosòmic 16S

A partir de DNA genòmic total es van amplificar els gens que codifiquen per a la subunitat 16S del RNA ribosòmic (16S rDNA) mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

La mescla de reactius per a la PCR contenia el tampó de reacció (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ i 10 mM a pH 9,0 Tris-HCl, concentracions finals); desoxinucleòtids trifosfat (dNTP, Roche) amb concentració final 100 µM; ambdós encebadors a una concentració final de 0,4 µM i finalment afegírem 2,5 U de l'enzim Taq DNA polimerasa

(GE Healthcare). El volum total de la reacció era de 50 µl. Les PCR es realitzaren a un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

Els encebadors utilitzats per a aquest estudi (Taula 3) s'uneixen a regions conservades del 16S rDNA; escollírem els encebadors 63f (Marchesi *et al.*, 1998) i 1389r (Osborn *et al.*, 2000), marcats amb els fluorocroms 6-carboxifluoresceïna (6-FAM) i un derivat hexaclorat (HEX), respectivament. Els encebadors fluorescents van ser sintetitzats per les companyies Applied Biosystems i Invitrogen (Gran Bretanya). Les temperatures i els temps de reacció utilitzats a la reacció de PCR foren: 94°C 2 min, 30 cicles a 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min i una extensió final de 10 min a 72°C. Els productes es visualitzaren mitjançant electroforesi en gels d'agarosa a l'1% (pes/vol), tinció amb bromur d'etidi i observació a la llum ultraviolada a un transil·luminador UPV (Richmond).

Taula 3: Llista dels encebadors utilitzats en aquest estudi.

Encebador	seqüència (5' → 3')	Temperatura d'aparellament	Referència
63f	caggcctaacacatgcaagtc	60°C	Marchesi <i>et al.</i> , 1998
1389r	acgggcgggtgtgtacaag	60°C	Osborn <i>et al.</i> , 2000
F357	actcctacgggaggcagcag	60°C	Lane <i>et al.</i> , 1991
F945	gggcccgcacaagcgggtgg	60°C	Modificat de Hauben <i>et al.</i> , 1997
R518	cgtattaccgcggtgctg	60°C	Lane, 1991
R1087	ctcgttgcgggacttaaccc	60°C	Lane, 1991

4.3. Purificació i digestió dels productes de PCR amplificats

Una vegada obtingudes les amplificacions, purificàrem els productes de PCR amb el kit de purificació QIAquick (Qiagen). Comprovàrem que teníem el producte de purificació per electroforesi a un gel d'agarosa a l'1% (pes/vol). Posteriorment, digeríem cada una de les mostres de productes purificats de PCR amb dues endonucleases de restricció, en dues reaccions per separat. Les endonucleases de restricció utilitzades van ser: *AluI* (Roche) que talla quan es troba la seqüència de nucleòtids 5'-AGCT-3' entre la guanina (G) i la citosina (C); i l'enzim *CfoI* (Roche) que talla a 5'-GCGC-3' entre la segona G i la segona C. Les diferències entre les dianes de restricció que presenten els enzims utilitzats, permetran la caracterització de les mostres d'aigua en relació a les diverses poblacions bacterianes. Aquestes poblacions es detectaran a partir de 4 mides de fragments, dos per a cada extrem (5' i 3' del 16S rDNA) i enzim (*AluI* i *CfoI*). A 10 µl de producte de PCR purificat afegírem 2 unitats de

l'enzim de restricció, el tampó de reacció recomanat per la companyia per cadascun dels enzims i aigua milliQ per arribar a un volum final de 15 µl. La digestió es feia a 37°C durant 3 hores i 30 minuts (Osborn *et al.*, 2000).

4.4. Separació dels fragments de restricció

La separació dels fragments de digestió es realitzà a un analitzador genètic ABI 310 (Applied Biosystems) als Serveis Científic Tècnics de la Universitat de les Illes Balears. En aquest equip la separació dels fragments de DNA es fa per electroforesis capil·lar, detectant amb làser els fragments marcats amb fluorescència, en el nostre experiment els fragments terminals 5' i 3' dels 16S rDNA.

L'electroforesi es feia a partir d'1 µl del producte digerit desnaturalitzat al que s'afegien 12 µl de formamida i 0,5 µl de marcador estàndard de pes molecular GS500ROX (Applied Biosystems), de forma que cada una de les mostres tenia un marcador intern. Les mostres es desnaturalitzaven a 96°C durant 5 minuts abans de córrer l'electroforesi segons les especificacions de la companyia. Les condicions en les que es realitzava l'electroforesi eren les següents: capil·lar de 47 cm de longitud i 50 µm de diàmetre; polímer POP-4 (Applied Biosystems); 10 segons de temps d'injecció de la mostra (voltatge d'injecció 15 kV), 30 minuts de duració de la carrera (voltatge de l'electroforesi 15 kV, 8-13 µA), potència del làser 9,2 mW. Es realitzaren rèpliques per a cada mostra. Les longituds dels fragments de restricció terminals (T-RF) marcats amb fluorescència es determinaren per comparació amb els estàndards interns, utilitzant el software Genescan v. 3.1 (Applied Biosystems) i el mètode d'interpolació "Local Southern" amb el límit mínim de detecció establert en 50 unitats de fluorescència.

4.5. Processament de dades

En primer lloc els electroferogrames van ser examinats per a detectar qualsevol imperfecció en les carreres i s'eliminaren tots els pics de mida menor a 35 nt i majors a 500 nt, degut a que es trobaven fora del rang del marcador de pes molecular. Posteriorment, les dades digitals obtingudes de l'anàlisi de T-RFLP van ser estandarditzades, per a poder equiparar les concentracions de DNA de diferents carreres i poder-les comparar entre elles. El mètode utilitzat per a aquest fi va ser el descrit per Fahy i col·laboradors (2005). Una vegada normalitzades les abundàncies, els pics homòlegs entre els perfils rèplica s'alinearen amb el programa T-Align (Smith *et al.*, 2005) per tal de generar un perfil consens per a cada mostra. Aquest procés es

realitzà igual per a tots els mostrejos: Port Adriano, Platja de Palma, Port de Palma i Ports de Mallorca. Per a cadascuna d'aquestes àrees analitzades es creà un arxiu que contenia un llistat dels pics electroforètics obtinguts en cada perfil (identificats per la mida mitjana) i l'abundància relativa de cadascun d'ells a cada perfil. Aquesta informació es va tractar amb el paquet informàtic "Palaeontological STatistics" ver. 1.29, PAST (Hammer *et al.*, 2001) a partir del qual es realitzaren tots els càlculs per a l'obtenció de dendrogrames, utilitzant el mètode "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean" (UPGMA; Sneath i Sokal, 1973) amb el coeficient de Bray-Curtis per a mesurar les distàncies entre els perfils.

5. ANÀLISI MOLECULAR DE GENOTEQUES DE 16S rDNA DE PORT ADRIANO

5.1. Preparació i anàlisi de genoteques de 16S rDNA

5.1.1. Selecció de mostres

En total realitzàrem 6 genoteques de productes de 16S rDNA amplificats per PCR a partir de DNA extrets de mostres d'aigua de tres estacions de Port Adriano als mesos de desembre i agost, que són els mesos que presenten mínimes i màximes temperatures a la mar. Les tres estacions escollides foren la del port a la zona més estancada (est. 18), l'estació de la badia (est. 5) i l'estació de la platja (est. 13).

5.1.2. Amplificació del gen per a RNA ribosòmic 16S

L'amplificació es realitzà exactament igual que per a l'anàlisi molecular per T-RFLP (apartat 4.2), a partir de DNA genòmic total, utilitzant els mateixos encebadors (63f i 1389r) sense marcatge amb fluorocroms. També es comprovaren els productes de PCR per electroforesi amb agarosa i tinció amb bromur d'etidi.

5.1.3. Clonació

La clonació es va fer amb el kit TOPO cloning (Invitrogen) seguint les recomanacions del fabricant. Les cèl·lules competents utilitzades eren *Escherichia coli* DH5 α -T1 i el vector pCR α 2.1-TOPO. Els clons transformats es seleccionaven en plaques d'agar Luria-Bertani (LB) amb ampicil·lina (75 μ g·ml⁻¹), X-gal (80 μ g·ml⁻¹) i IPTG (0,2 mM), les quals s'incubaven a 37°C durant 18-24 h. Es van seleccionar aquelles colònies que presentaven coloració blanca, la qual cosa, indicava la

incorporació d'un insert al plasmidi. Per a cada mostra s'aconseguien uns 200 clons dels quals s'analitzaren aproximadament 120.

5.1.4. Anàlisi i selecció dels clons mitjançant polimorfisme de longitud de fragments de restricció (RFLP)

Primer es comprovà, per PCR, que la mida dels inserts incorporats als plasmidis es corresponia a l'esperada pels amplicons de 16S rDNA (aprox. 1500 nt), amb els encebadors M13 i RM13 que hibriden amb el plasmidi pCR®2.1-TOPO abans i després de la zona d'inserció. Les concentracions dels reactius i condicions de les PCR van ser les mateixes que les descrites a l'apartat 4.2., excepte pel que fa el volum final de reacció, que va ser de 25 µl. Els productes es visualitzaren a partir de l'electroforesi en gel d'agarosa com s'ha indicat prèviament.

Una vegada seleccionats els 120 clons amb l'insert de la mida esperada de cada una de les genoteques, passàrem a digerir els productes de PCR amb els mateixos dos enzims de restricció utilitzats per l'anàlisi de T-RFLP (*Alu* I i *Cfo* I; apartat 4.3.), en dues reaccions per separat. Les digestions es realitzaven com s'ha descrit a l'apartat 4.3. Seguidament la separació dels fragments es feia per electroforesi, amb gels preparats amb agarosa NuSieve 3:1 (Cambrex) al 3% (pes/vol) en TAE. A partir dels gels analitzàvem visualment els patrons de digestions (RFLP) per a cada un dels clons estudiats, comparant tots els patrons obtinguts per a cadascun dels dos enzims. Aquells clons d'una mateixa genoteca que ens donaven un mateix patró a *Alu* I i *Cfo* I els agrupàvem. Finalment es compararen els diferents grups d'RFLP obtinguts entre les sis genoteques realitzades.

5.1.5. Seqüenciació dels clons representatius dels diferents grups d'RFLP

Per a cada grup d'RFLP constituït per dos o més clons es seqüencià un clon representant. La reacció de seqüenciació es feia a partir del plasmidi extret amb el kit de QIAprep spin miniprep (Qiagen) i també des del producte de PCR, comprovant posteriorment, amb un gel d'agarosa que l'extracció hagués funcionat correctament. Per a les reaccions de seqüenciació es va utilitzar el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v.3.1 (Applied Biosystems), d'acord amb les especificacions del fabricant. Els encebadors utilitzats s'indiquen a la Taula 3. Les condicions de la reacció de seqüenciació eren de 25 cicles de 15 segons a 96°C, 15 segons a 60°C, 4 minuts a 60°C i acabats els cicles manteníem a 14°C les mostres fins a la precipitació del producte que es feia seguint les recomanacions dels fabricants. Seguidament les mostres s'enviaren a la Unitat de Seqüenciació d'ADN de l'Hospital de Son Dureta

(Palma, Espanya) i al Servicio de Secuenciación de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, Espanya) per a la seva anàlisi.

5.2. Anàlisi filogenètica

Es seqüenciaren en total 82 clons del conjunt de les 6 genoteques. El nombre de seqüències de 16S rDNA pràcticament completes (1.300 nt aproximadament) varen ser 27; la resta eren seqüències parcials amb un mínim de 400 nt. Totes les seqüències s'analitzaren amb el Chimera Check (Cole *et al.*, 2003), per a detectar qualsevol quimera obtinguda entre les seqüències. Les seqüències de 16S rDNA verificades es compararen en primer lloc amb les seqüències de la base de dades de l'EMBL (Crochane *et al.*, 2008) utilitzant el programa FASTA (Pearson i Lipman, 1988) per a determinar les afiliacions filogenètiques aproximades. Posteriorment les seqüències de 16S rDNA s'alinearen amb les seqüències de referència de la base de dades del paquet informàtic ARB (Ludwig *et al.*, 2004); i es calcularen els valors de similitud entre les seqüències. Els arbres filogenètics es calcularen amb el mètode de Neighbor-joining (Saitou i Nei, 1987) a partir de matrius de distància calculades utilitzant la correcció de Jukes-Cantor (Jukes i Cantor, 1969). Per al càlcul dels arbres es van considerar únicament les seqüències de 16S rDNA més llargues (aprox. 1.300 nt), i posteriorment s'afegiren les seqüències parcials als arbres amb l'eina d'inserció per parsimònia del paquet informàtic ARB. Es van aplicar filtres per a cada grup bacterià que limitaven la comparació a aquelles posicions que presentaven una homologia mínima del 50%.

Amb la finalitat de realitzar una comparació de la composició de les diferents genoteques es va utilitzar el programa LIBSHUFF (Schloss *et al.*, 2004) a través de la seva interfície a la xarxa (webLIBSHUFF v.0,96, Henriksen; URL:<http://libshuff.mib.uga.edu>). Els càlculs es realitzaren a partir dels valors de les matrius de distància obtinguts amb ARB i utilitzant la màxima longitud de seqüència comú a totes elles. El programa LIBSHUFF ens va permetre comparar les genoteques de les estacions de port, badia i platja, considerant conjuntament les seqüències obtingudes l'agost i el desembre. Les comparacions es feren per parelles: port-platja, platja-badia, badia-port.

Les seqüències generades en aquest estudi han estat dipositades a la base de dades EMBL amb els números d'accés AM747303-AM747384.

5.3. Anàlisi molecular per T-RFLP dels clons majoritaris

El clon representatiu per a cada grup constituït per dos o més clons, a més de ser seqüenciat, també es seleccionà per analitzar el seu perfil de T-RFLP. Utilitzant la mateixa metodologia que a l'apartat 4, es caracteritzà cada clon representatiu amb 4 mides de fragments de 16S rDNA (T-RF) corresponents a l'extrem 5' (marcat amb 6-FAM) i a l'extrem 3' (marcat amb HEX) dels enzims de restricció *AluI* i *CfoI*. Aquests T-RF varen ser comparats amb els obtinguts a les mostres ambientals.

6. CÀLCUL D'ÍNDEXS DE DIVERSITAT I ANÀLISI ESTADÍSTICA

Per tal d'analitzar el conjunt de dades obtingudes en aquest treball, calculàrem diferents índexs de diversitat. Aquests índexs ens permetien comparar de forma senzilla, mitjançant un valor numèric, la diversitat de les mostres, i per tant de les comunitats bacterianes caracteritzades a tots els mostrejos.

En primer lloc calculàrem la cobertura (Good, 1953) de les genoteques, índex que defineix quant de ben caracteritzada està una comunitat tenint en compte el nombre d'individus que s'han analitzat.

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

On n_1 és el nombre de clons únics que obtenim a cada genoteca; N és el nombre de clons totals analitzats.

Per a l'estudi de diversitat es calculà l'índex de Shannon (H') (Shannon, 1948), que mesura la quantitat d'informació (entropia) en el sistema, per tant mesura la dificultat en predir la identitat del pròxim individu analitzat. Aquest índex és sensible a la riquesa d'espècies i a l'abundància relativa d'aquestes a dins la comunitat, a més està influenciat pels canvis d'abundància dels grups amb un sol representant (Hill *et al.*, 2003).

$$H' = -\sum \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

On n_i és el nombre de clons que obtenim per a cada grup i i N és la mateixa variable anterior.

El càlcul de l'índex J (Lloyd i Ghelardi, 1964) permet mesurar la proporció d'individus dins les comunitats, indicant si hi ha poblacions dominants a cadascuna de les mostres. Es calcula a partir de l'índex de Shannon, partint de la relació entre

l'abundància de grups observats i l'abundància associada a una situació hipotètica en la que hi ha la màxima diversitat ($n_i=1$). Quan el valor de J s'aproxima a zero hi ha una espècie dominant, quan el valor és 1, vol dir que la comunitat presenta la màxima diversitat.

$$J = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

Per al càlcul d'aquest índex s'utilitzà el paquet informàtic "Palaeontological STadistics" ver. 1.29, PAST (Hammer *et al.* 2001).

Un altre dels mètodes d'anàlisi utilitzats per a l'estudi de la diversitat de les mostres analitzades van ser les corbes d'enriment ("rarefaction") que permeten una significativa estandardització i comparació de les dades obtingudes (Gotelli i Colwell, 2001). Per a la realització de les corbes s'utilitzà també el programa PAST v.1.29 i la fórmula emprada pels càlculs era la següent:

$$E = \sum \left[1 - \frac{\binom{N - n_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right]$$

On E és el nombre de filotips i la resta de variables ja han estat explicades anteriorment.

L'anàlisi estadística de les dades es va fer amb el paquet informàtic SPSS v 13.0 (SPSS Inc.). S'utilitzaren mètodes estadístics multivariables com l'Anàlisi de Components Principals (PCA) i el mètode d'escalat multidimensional no mètric (NMDS), ambdues tècniques estadístiques sintetitzen la informació i permeten la interpretació de les dades mitjançant la seva representació. També es calcularen correlacions estadístiques entre els diferents paràmetres analitzats, per tal de conèixer la relació lineal entre dos d'aquests paràmetres.

També es realitzà una Anàlisi de Similituds (ANOSIM), un test no paramètric per a comparar els grups obtinguts a partir dels perfils de T-RF, indicant si existien diferències significatives entre els grups, s'aplicà el programa PAST per a l'anàlisi.

RESULTATS

Capítol 1:

Descripció de l'entorn a Port Adriano

Nogales, B., Aguiló-Ferretjans, M.M., Martín-Cardona, C., Lalucat, J., Bosch, R. Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. Environ. Microbiol. 9(2007): 1913-1929

L'àrea de mostreig de Port Adriano es caracteritzà a partir d'una sèrie de paràmetres físics, químics i biològics determinats a cada estació de mostreig definida. Aquests paràmetres eren: temperatura, salinitat, conductivitat, concentració de compostos hidrofòbics, concentració de clorofil·la *a* i recompte de cèl·lules procariòtiques. El mostreig es va realitzar durant 14 mesos, des del mes de maig del 2001 al mes de juliol del 2002. També s'analitzaren alguns paràmetres meteorològics i oceanogràfics pròxims a l'àrea de mostreig.

1. PARÀMETRES METEOROLÒGICS I OCEANOGRÀFICS RELLEVANTS DURANT EL PERÍODE DE MOSTREIG

Amb la finalitat de caracteritzar l'època i la zona de mostreig s'identificaren diferents paràmetres meteorològics dels anys 2001 i 2002, com la temperatura de l'aire, les precipitacions i l'onatge.

A la Fig. 11 es representa la mitjana mensual de la temperatura de l'aire i de les precipitacions que es mesuraren a l'Institut Meteorològic de Palma (Observatori de l'Aeroport de Son Sant Joan). Les variacions de temperatura de l'aire entre l'any 2001 i 2002 no varen ser destacables, especialment a l'època que es realitzà el mostreig, només les temperatures primaverals del 2001 eren lleugerament més elevades. Les temperatures de l'aire van presentar un comportament típic del clima mediterrani, màximes a l'estiu i hiverns suaus. Les precipitacions de l'any 2001 seguien també el patró de clima mediterrani, amb precipitacions abundants als mesos de tardor i menys importants a la primavera i escasses o nul·les a l'estiu. Però l'any 2002 va ser un any molt atípic en quant a precipitacions, en general, un any molt plujós i de forma molt remarcable als mesos d'estiu. Així, és destacable la diferència en les precipitacions durant els mesos de maig, juny i juliol del 2002, en comparació amb les precipitacions obtingudes durant aquests mesos l'any anterior.

Pel que fa a característiques oceanogràfiques de la regió mostrejada, es va analitzar l'onatge modelat numèricament a les coordenades: 39,5 N; 2.375 E (Punt WANA 2067036), zona pròxima a l'àrea del mostreig (dades extretes de "Puertos del Estado", URL: <http://www.puertos.es>). La direcció sud-oest va ser la predominant en l'onatge d'aquesta àrea a ambdós anys (Fig. 12). L'única diferència destacable entre els anys estudiats va ser una major presència d'onatge en direcció nord-oest i oest a l'any 2002. L'alçada de les ones no superava, en la majoria del temps, el mig metre i

com a màxim arribava a 1,5 m en poques ocasions, sempre en els mesos de tardor-hivern.

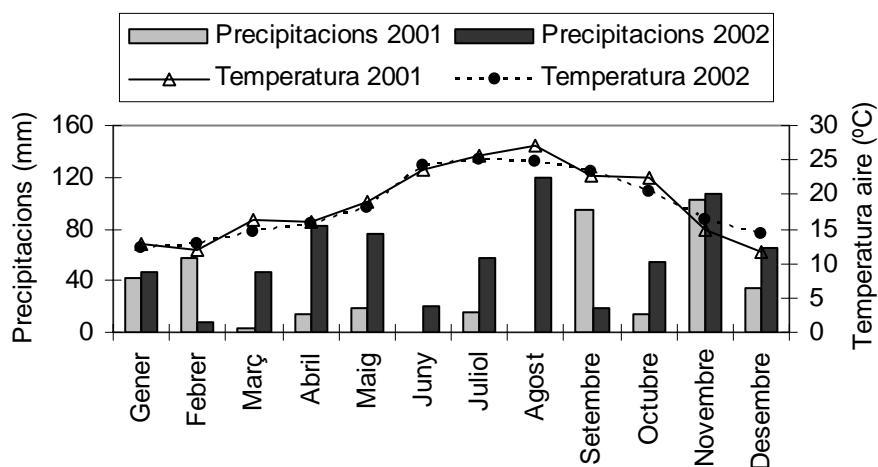


Fig.11: Precipitacions i temperatures de l'aire mitjanes mensuals recollides al Centre Meteorològic de Palma (Aeroport de Son Sant Joan) els anys 2001 i 2002 (dades extretes de "Instituto Nacional de Meteorología" recollides al "Anuario Estadístico de España", URL: <http://www.ine.es/inebase>).

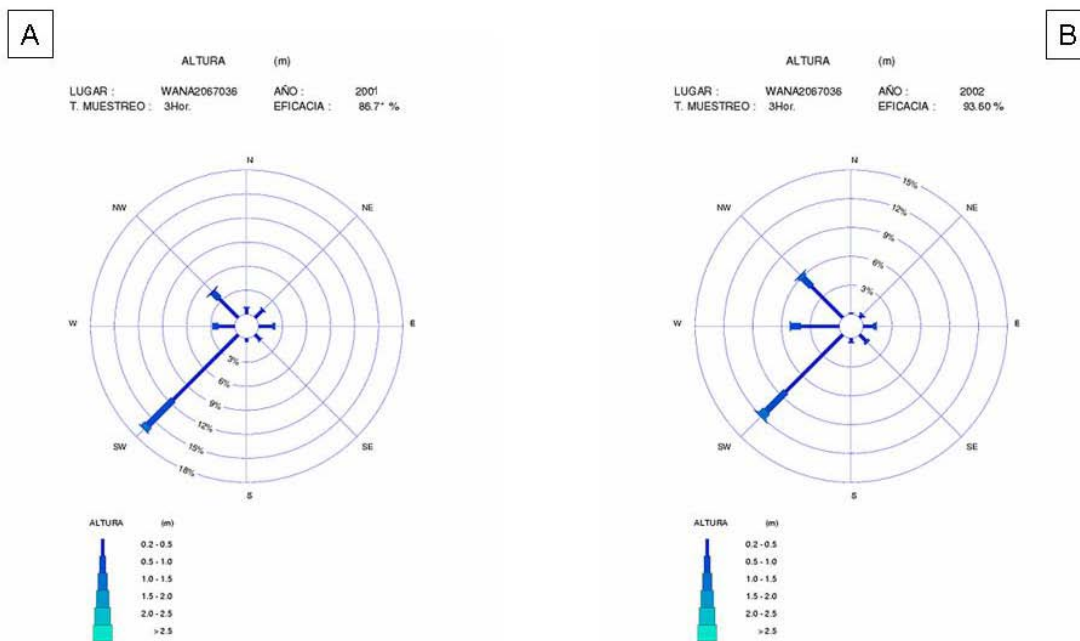


Fig.12: Roses d'onatge del punt analitzat més proper a la zona de mostreig WANA 2067036. A: any 2001 B: any 2002. Dades extretes de Puertos del Estado.

2. VARIACIONS DELS PARÀMETRES FÍSICOQUÍMICS DETERMINATS A LES ESTACIONS DE MOSTREIG.

2.1. Temperatura de l'aigua del mar

El més destacat de la variació de les temperatures eren les diferències que es produïen entre l'estiu i l'hivern, però no s'observaren diferències remarcables entre les diferents estacions de mostreig (Fig. 13, A i B). La variació tèrmica estiu-hivern a l'aigua de mar superficial a totes les estacions era d'aproximadament de 13°C (Fig. 13A). Totes les estacions presentaven una amplitud interquartil de temperatura de 8 graus (18-26°C), llevat de les estacions 12 i 15 (19-26°C) i l'estació 18 (17-26°C). La temperatura superficial de l'aigua va assolir temperatures mínimes lleugerament inferiors en les estacions del port, la platja i les zones adjacents (est. 11-14 i 16-18).

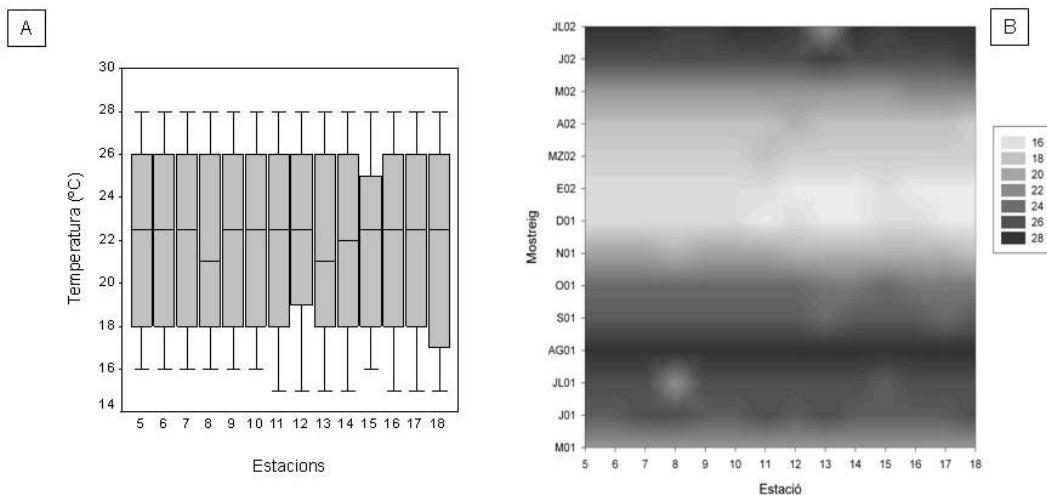


Fig.13: Valors de temperatura de l'aigua de mar. A: Diagrama de caixes dels valors mensuals de la temperatura de l'aigua per a cada estació analitzada. Es representen els valors de la mediana, els màxims i mínims i l'amplitud interquartil per a cada estació. B: Variacions mensuals de la temperatura representades mitjançant escales de grisos.

2.2. Variacions del pH

A diferència de la homogeneïtat en els valors de temperatura entre les diferents estacions de mostreig, es va observar una major variabilitat en quant al pH de l'aigua (Fig. 14). Els valors de pH mesurats a l'aigua superficial estaven en un rang entre 7,8 i 8,5, amb valors mitjans entorn a 8,1-8,2 a les diferents estacions. L'amplitud interquartil dels valors de pH a la majoria de les estacions era de 0,1 unitats (8,1-8,2), essent de 0,2 unitats a les estacions 8, 12 i 14 (8,1-8,3) i de 0,3 unitats a l'estació 9. Els valors de pH eren més elevats en els mesos de tardor-hivern (octubre-

gener), excepte a algunes estacions com les més internes del port (est. 17 i 18) on, contràriament a la resta d'estacions, els valors de pH en aquests mesos van ser mínims. Els valors mínims es produïren majoritàriament al mes de juny del 2002 i en molts de casos (est. 5, 10, 11 i 13) allunyats del rang on es trobaven la resta dels valors de pH

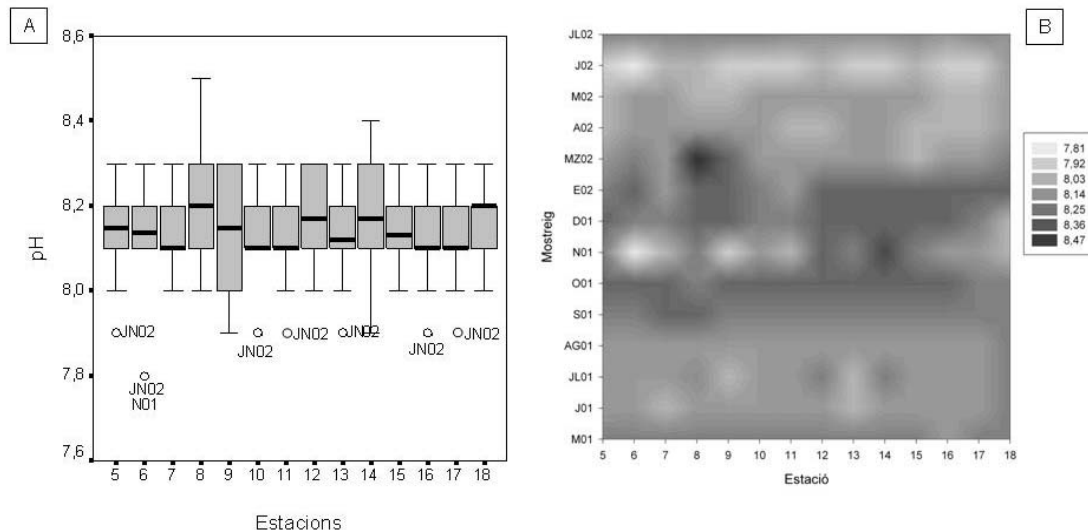


Fig.14: Representacions dels canvis de pH. A: Diagrama de caixes dels valors de pH (° valors atípics: entre 1,5 i 3 la longitud interquartil). B: Variacions mensuals dels valors de pH a cada estació de mostreig.

2.3. Salinitat i conductivitat

Els paràmetres de salinitat i la conductivitat es van mantenir relativament estables a les diferents estacions estudiades (Fig. 15 i 16). Les variacions de salinitat més rellevants eren les produïdes a l'estació 11, la qual presentava de forma característica valors de salinitat i conductivitat inferiors a la resta d'estacions a tots els mesos del mostreig (especialment al desembre del 2001 i al març del 2002) i amb una major amplitud interquartil. La salinitat màxima s'observà principalment al juliol del 2002, quan la temperatura de l'aigua de la mar presentava els màxims valors, i en general en els mesos d'estiu. El mes en que es detectaven valors mínims de salinitat a totes les estacions era el març del 2002, especialment evident en les estacions del port (17 i 18). A la zona del port també s'observà una disminució de la salinitat durant els mesos de tardor (setembre, octubre i novembre).

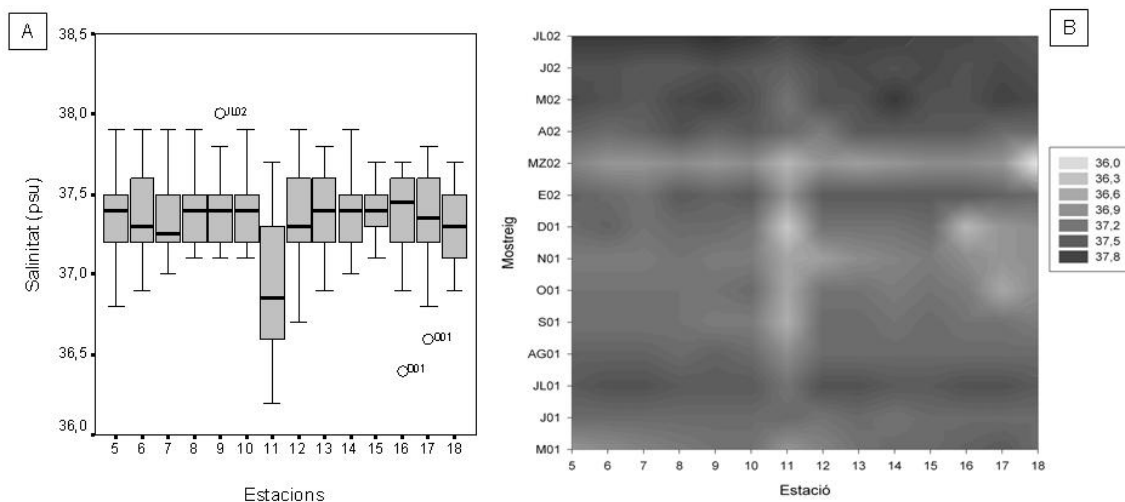


Fig.15: Representacions dels valors de salinitat. A: Diagrama de caixes dels valors mensuals de salinitat ($^{\circ}$ valors atípics: entre 1,5 i 3 de la longitud interquartil). B: Variacions mensuals de salinitat a cada estació.

Malgrat que la salinitat i la conductivitat són paràmetres relacionats s'observaren algunes diferències en quant a la dinàmica d'aquests dos paràmetres (Fig.16). Tal com succeïa amb la salinitat, els valors mínims de conductivitat es produïen al mes de març del 2002 (especialment dins del port) i els màxims als mesos d'estiu (especialment l'any 2002). Però a diferència del que s'observà en la salinitat

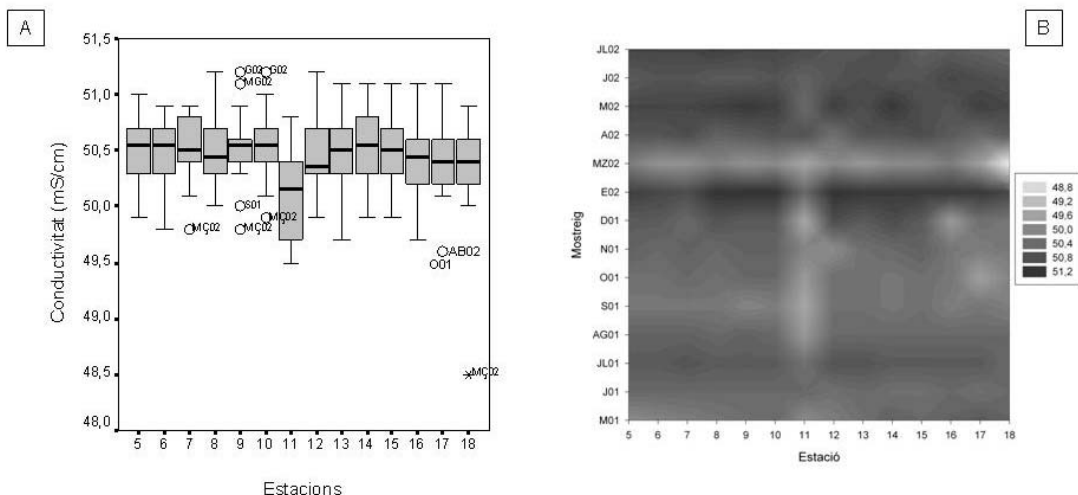


Fig.16: Representacions dels valors de conductivitat. A: Diagrama de caixes dels valors mensuals de conductivitat ($^{\circ}$ valors atípics: entre 1,5 i 3 la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 longitud interquartil). B: Variacions mensuals de conductivitat a cada estació.

els valors més elevats de conductivitat es detectaven al mostreig de gener del 2002 a la majoria d'estacions. A dins el port (est. 16, 17 i 18) es detectaven també disminucions general de valors de la conductivitat en els mesos de tardor, com passava amb la salinitat. L'amplitud interquartil dels valors de conductivitat eren semblants per totes les estacions amb l'excepció de l'estació 11, com s'observà també amb la salinitat.

Cal recalcar que els paràmetres de pH, salinitat i conductivitat presentaven un augment destacable dels seus valors entre els mesos de maig, juny i juliol de l'any 2002 respecte dels valors de 2001. Per tant es produïa una variabilitat anual significativa entre aquestes dades.

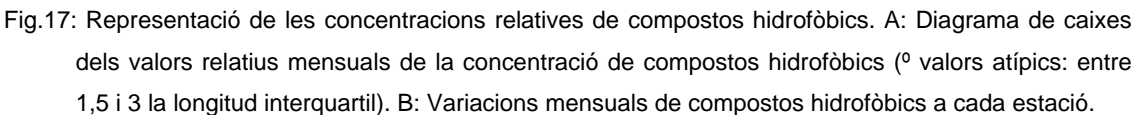
3. VARIACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE COMPOSTOS HIDROFÒBICS

Un dels paràmetres que podrien facilitar l'avaluació de l'impacte derivat de l'activitat portuària era la concentració d'hidrocarburs, degut a que la seva presència i abundància ens permetria caracteritzar la importància i la influència del port esportiu a la zona, a més, de poder estudiar la seva possible rellevància en la dinàmica de les poblacions bacterianes. La mesura de la concentració de compostos hidrofòbics (CH), no volàtils en l'aigua era doncs, una aproximació a la concentració d'hidrocarburs presents a l'aigua.

Els valors relatius de cada una de les mostres es calcularen respecte a les concentracions mitjanes de les mostres localitzades a dins el port (a Port Adriano est. 16, 17 i 18) per a cada mostreig.

Les concentracions mitjanes relatives de compostos hidrofòbics eren majors a les estacions situades a dins al port (est. 16, 17 i 18) i properes a aquest (est. 13, 14 i 15) (Fig. 17A), i inferiors a les estacions més allunyades del port (est. 5-12) tal i com era d'esperar. En canvi, observant les concentracions d'aquests compostos a l'aigua superficial els diferents mesos mostrejats (Fig. 17B) es podia determinar en quins moments aquestes eren més baixes i això coincidí amb els mesos d'estiu d'ambdós anys, durant els quals la concentració de CH a l'aigua va ser baixa a totes les estacions. En dues ocasions, al setembre del 2001 i al març del 2002 es van observar concentracions elevades de CH a totes les estacions, i especialment altes a estacions allunyades del port (per exemple est. 5, 6, 9 i 10), tal com es pot observar a les Fig. 17A i 17B. El diagrama de caixes de la figura 17A mostra que l'amplitud interquartil era major a les estacions 5-12, en les quals les variacions en les concentracions de

Els valors màxims de les estacions del port i voltants (est. 13 a 18) es detectaren al mes de juny del 2001. A la resta de les estacions el màxim es detectava a diferents mesos, principalment al mes de setembre. Els valors mínims es trobaven sempre a l'agost a les estacions de fora port (est. 6 a la 12) i al mes de juliol del 2001 de l'estació 13 a la 18.



la zona est de l'àrea mostrejada. En els mesos on s'obtenien importants concentracions a les estacions més allunyades del port (setembre 2001 i març 2002) els mapes mostren que mentre en el primer cas els CH eren abundants a pràcticament tota la badia, llevat de la zona més propera del port, en el segon cas l'abundància era major en la zona central i oest de la Badia. Finalment, la comparació dels mapes dels mesos de juny dels dos anys, 2001 i 2002 (Fig. 18 A i D), ens mostrava que les variacions en les concentracions de compostos hidrofòbics no presentaven un patró de variació anual clar.

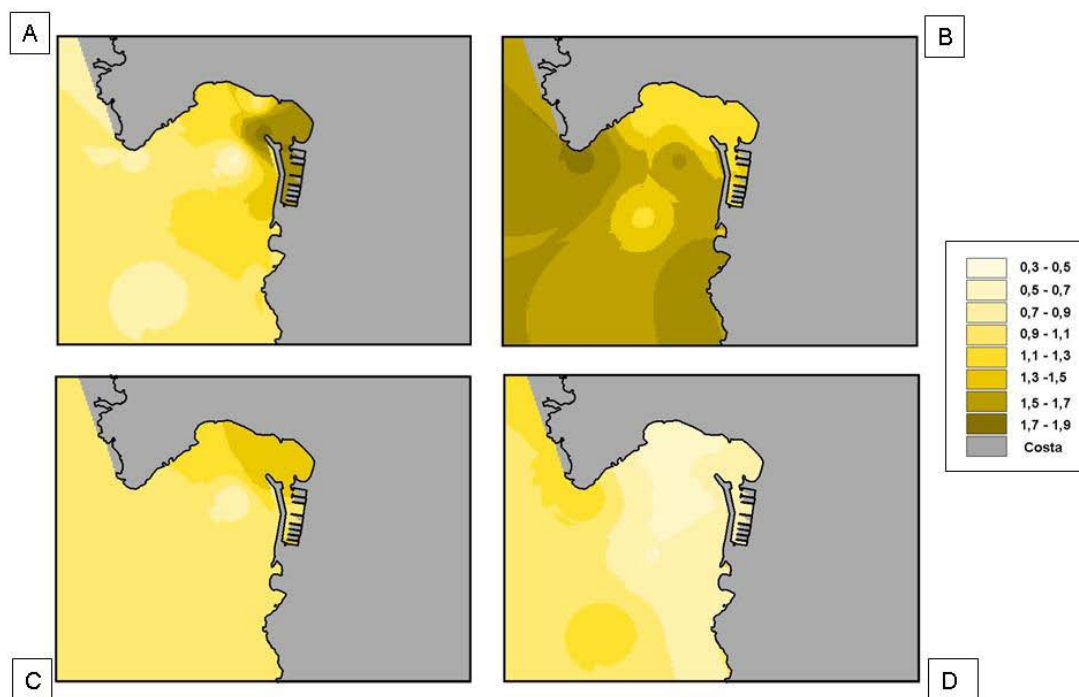


Fig.18: Variació espacial de les concentracions relatives de compostos hidrofòbics calculades mitjançant SIG. A: Juny 2001, B: Setembre 2001, C: Octubre 2001 i D: Juny 2002.

A pesar de totes les variacions que es detectaven en la concentració de composts hidrofòbics, calculant la mitjana dels valors per a cada estació en els diferents mesos analitzats, els valors màxims es trobaven sempre a dins de l'àrea portuària, disminuint en relació a la distància de la bocana, com es pot veure a la Figura 19.

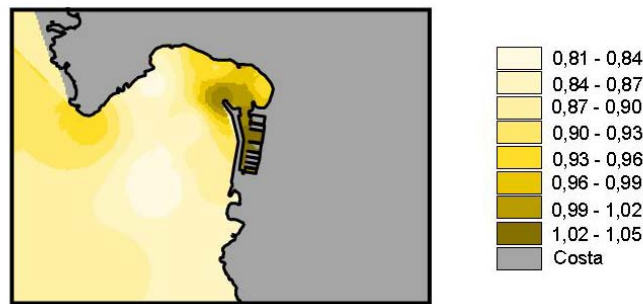


Fig.19: Mitjana mensual de les concentracions dels compostos hidrofòbics detectades a les 14 estacions de mostreig.

4. VARIACIONS DE PARÀMETRES BIOLÒGICS DETERMINATS A LES ESTACIONS DE MOSTREIG

4.1. Variació de la concentració de clorofil·la *a*

Un dels paràmetres biològics analitzats va ser la concentració de clorofil·la *a*, emprada freqüentment per a estimar la biomassa fitoplanctònica (Bird i Kalff, 1984); i utilitzada com a variable de referència per a l'estudi del fitoplàncton al medi aquàtic. A més, les interpretacions de la distribució de les poblacions bacterianes al mar han anat moltes vegades lligades a la distribució espacial i temporal de la clorofil·la (Pinhassi i Hagström, 2000).

L'estudi de la clorofil·la *a*, tal i com es preveia, presentava una important variabilitat al llarg de la zona de mostreig. Tal com es mostra a la Fig. 20 s'apreciava un augment de la concentració de clorofil·la *a* a les estacions de l'àrea portuària (est. 16-18). L'augment dels valors de la concentració de clorofil·la començava a detectar-se a partir de les estacions 13 i 14. En canvi, l'estació 15, situada darrera l'espigó de la bocana del port, presentava un comportament semblant a les estacions més allunyades del port (est. 5-12). Tant els valors mitjans de concentració de clorofil·la, com els valors de la mediana, l'amplitud interquartil i el rang de concentracions eren significativament majors a les estacions del port. Majoritàriament els màxims de concentracions de clorofil·la detectats a les estacions de fora port, inclosa la 15, es detectaren al mes de gener, mentre que els màxims de les estacions portuàries es donaren a l'estiu. Els mínims valors de clorofil·la *a* es detectaren al març del 2002 pràcticament a totes les mostres.

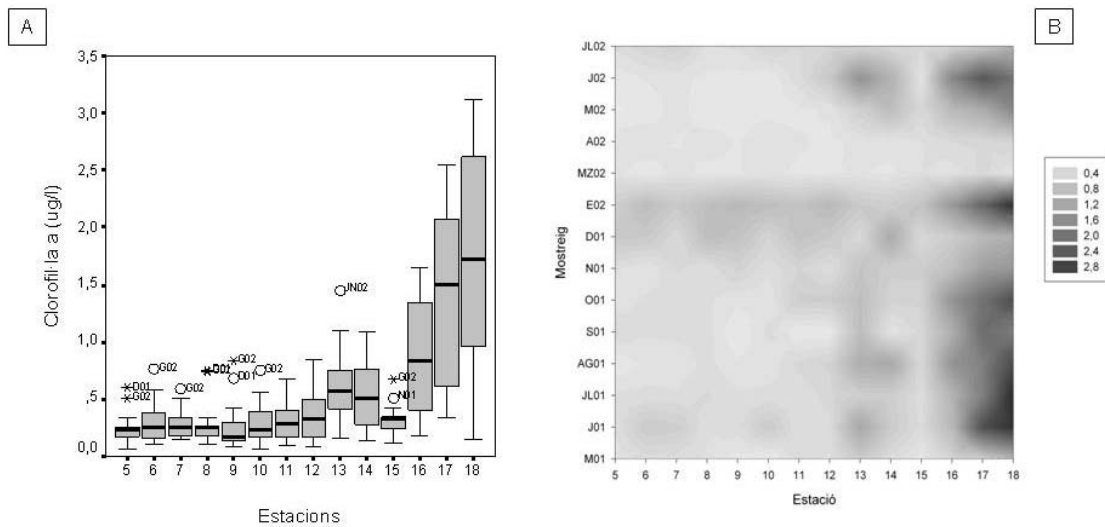


Fig.20: Representacions dels valors de la clorofil·la a ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). A: Diagrama de caixes dels valors mensuals de clorofil·la ($^{\circ}$ valors atípics: entre 1,5 i 3 la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 longitud interquartil). B: Variacions mensuals a cada estació.

Les variacions de la zona de mostreig estan representades mitjançant SIG a les imatges de la Figura 21. Es mostren els mapes representatius de diferents situacions que corresponen als mesos d'agost i desembre de 2001 i gener i juny de 2002. Els mapes de concentració de clorofil·la generalment mostraven que l'àrea de concentracions elevades d'aquest pigment (restringida a port i platja) era molt menys extensa que l'àrea on s'observaven concentracions més elevades de compostos hidrofòbics (Fig. 18). En algun cas, com per exemple al mostreig de juny del 2001 (Fig. 21A) i sobretot al desembre del 2001 (Fig. 21B) s'observaven concentracions més altes de clorofil·la a les zones de la badia més properes a la línia de costa. La comparació dels mapes dels mesos de juny de 2001 (Fig. 21A) i 2002 (Fig.21D) també mostrarà una certa variabilitat interanual en les concentracions de clorofil·la a la zona estudiada.

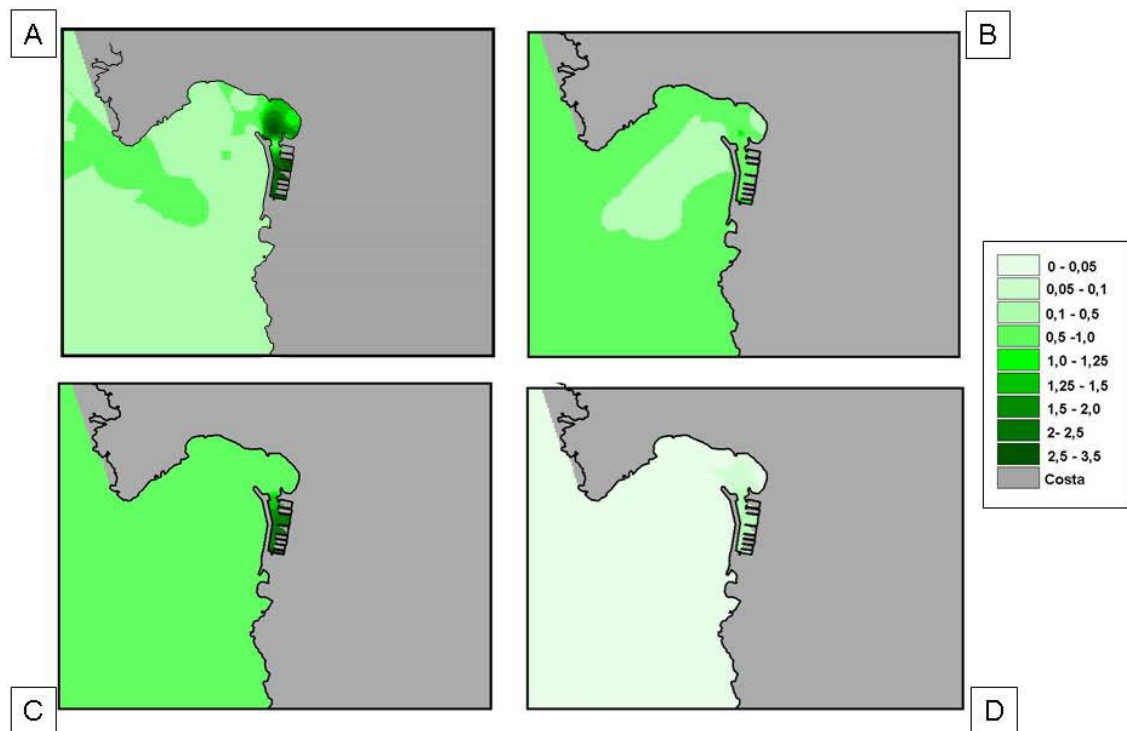


Fig.21: Variació espacial de les concentracions de clorofil·la a ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) calculades mitjançant SIG. A: Juny 2001, B: Desembre 2001, C: Gener 2002 i D: Juny 2002.

A la imatge que es presenta a la Fig. 22 que mostra la mitjana dels valors obtinguts als diferents mesos es pot veure que la major concentració de clorofil·la es troba a dins el port, sent la part més interna i estancada la que presentava els valors màxims i aquests disminueixen amb l'aproximació a la bocana. A la zona propera a la platja, la concentració de clorofil·la era més abundant que a la zona de la badia, on els valors de la mitjana eren els més baixos de l'àrea de mostreig.

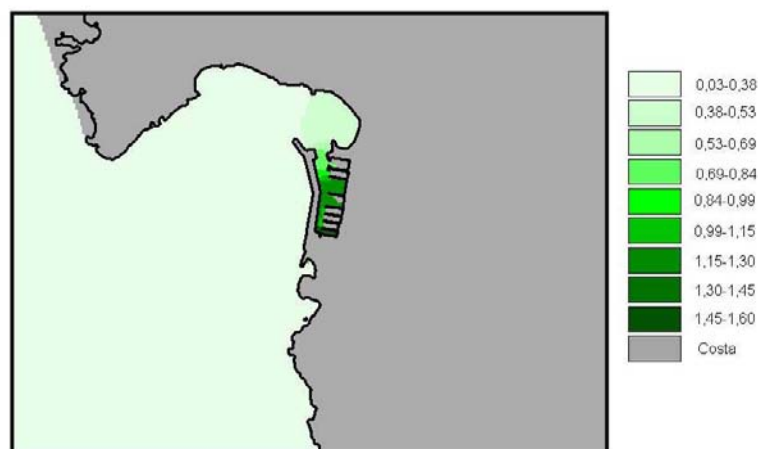


Fig.22: Mitjana mensual de les concentracions de clorofil·la a ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a les 14 estacions de mostreig.

4.2. Determinació del nombre total de cèl·lules i de cèl·lules presumptament actives

Altres paràmetres biològics determinats varen ser el nombre de cèl·lules totals per mil·lilitre, i el percentatge respecte al total de les cèl·lules presumptament actives, definides com aquelles que tenien un número elevat de ribosomes i que es podien detectar per hibridació amb la sonda universal EUB338 (domini *Bacteria*). Els recomptes es van fer en els mesos d'agost, octubre, desembre del 2001 i maig, juny i juliol del 2002, a totes les estacions llevat de la 17.

A l'igual que s'observava per la clorofil·la *a*, els recomptes de cèl·lules totals augmentaven en les estacions del port (est. 16 i 18) o properes a ell (est. 13 i 14) en tots els mesos analitzats (Fig. 23 i 24) pràcticament un ordre de magnitud (de l'ordre de 10^5 a 10^6 cèl·lules·ml⁻¹). Així la mediana i l'amplitud interquartil de les dades variaven poc en les estacions de la 5 a la 12, mentre que les estacions 13, 14, 16 i 18 presentaven mitjanes, medianes i amplituds interquartils bastant més elevades que la resta (Fig. 23A). L'estació 15 a pesar de tenir una amplitud interquartil considerable en quant al nombre de cèl·lules totals tenia una mediana més propera a les estacions de fora port. Els valors màxims de recomptes de cèl·lules totals per a totes les mostres es detectaven generalment al mes de juny de 2002. Els valors mínims es trobaven principalment al mes de desembre del 2001. Cal remarcar l'estació 14 degut a que era la mostra que presentava un rang de valors més ampli i la mediana més elevada de totes les mostres.

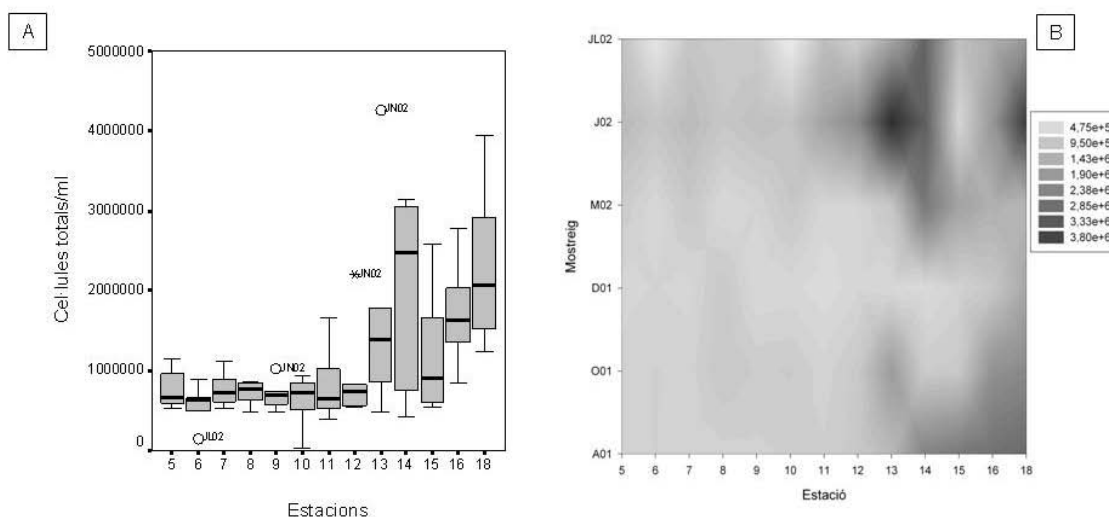


Fig.23: Representacions dels valors del recompte de cèl·lules totals per mil·lilitre. A: Diagrama de caixes dels valors de cèl·lules totals (° valors atípics: entre 1,5 i 3 la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 longitud interquartil). B: Variacions mensuals de cèl·lules totals a cada estació.

El nombre de cèl·lules es veia afectat tant pel temps com per l'espai, és a dir, destacava la influència del port i de la estacionalitat (efecte de les elevades temperatures estivals), com es pot veure a partir de les imatges obtingudes amb SIG (Fig. 24). Així doncs, s'observà un major nombre de cèl·lules totals en la zona del port, platja i en la seva proximitat. La superfície de la zona amb un elevat nombre de cèl·lules era major als mesos de primavera-estiu.

Per a comparar els resultats obtinguts amb el DAPI i el FISH es calcularen els percentatges de bacteris detectats amb la sonda EUB338 respecte al total de cèl·lules, el que indicaven aquests percentatges era el grau de detecció de bacteris actius a la zona de mostreig. Els resultats es mostren a la Fig. 25. Els percentatges de detecció de bacteris mitjans eren més del doble en les mostres d'aigua del port (est. 16 i 18) i la platja (est. 13 i 14). Els diagrames de caixes (Fig. 25A) ens presenten les estacions 13 i 14 com les que tenen el percentatge de bacteris actius més variables entre les diferents mostres i les menys variables les estacions 12, 16 i 18. Les

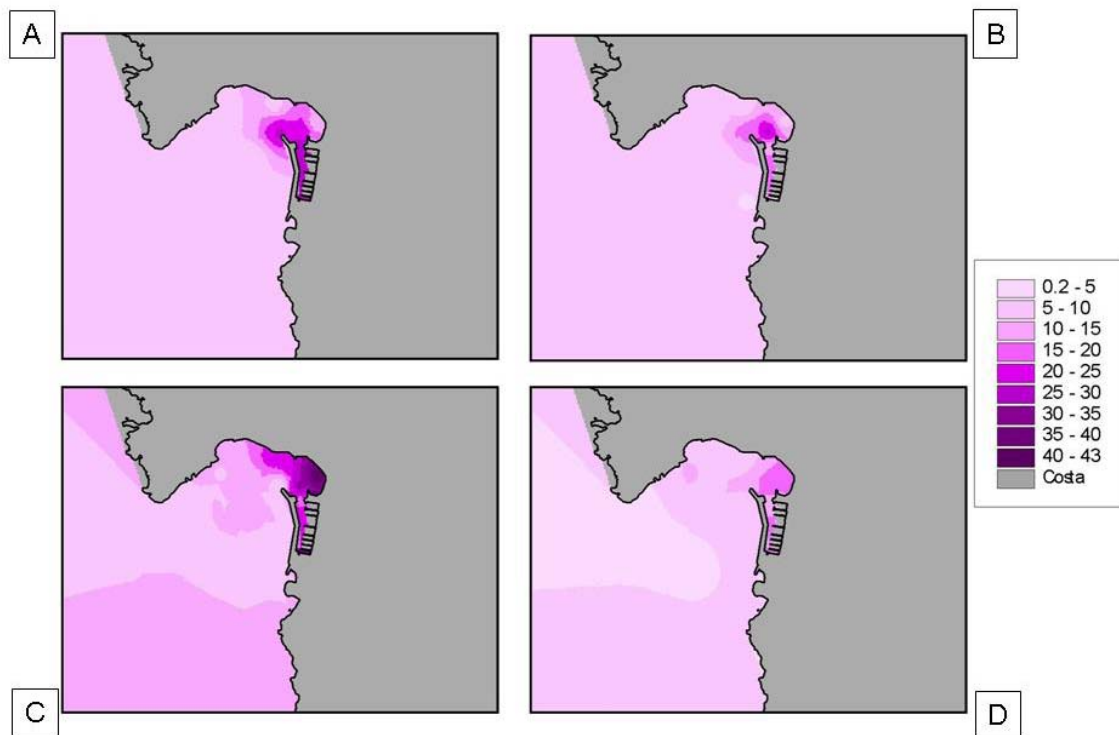


Fig.24: Variacions espacials del nombre de cèl·lules totals per mil·lilitre ($\times 10^5$) d'alguns mesos analitzats mitjançant SIG. A: Agost 2001, B: Maig 2002, C: Juny 2002 i D: Juliol 2002.

medianes i amplituds interquartils de les estacions de la badia no presentaven tanta homogeneïtat com l'observada en els recomptes de cèl·lules totals, encara que els valors seguien essent més baixos que al port i a la platja. Els valors màxims en els

percentatges de bacteris actius es produeixen principalment a l'estiu i els mínims tenien lloc al desembre.

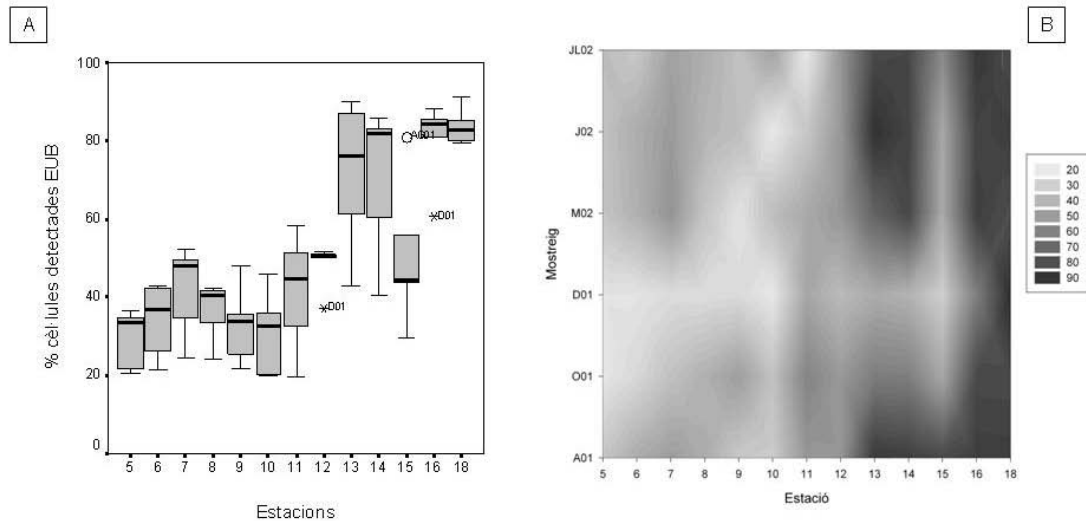


Fig.25: Representacions dels valors dels percentatges de cèl·lules detectades amb EUB338 respecte al total de cèl·lules. A: Diagrama de caixes dels percentatges obtinguts (° valors atípics: entre 1,5 i 3 la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 longitud interquartil). B: Variacions mensuals dels percentatges de cèl·lules detectades amb EUB338 a cada estació analitzada.

Els mapes de superfície del percentatge de cèl·lules detectades amb la sonda EUB338 respecte al total de cèl·lules es representen a la Fig. 26. Comparant els mapes obtinguts s'observà que les zones d'increment de cèl·lules també eren zones on incrementava l'activitat bacteriana, tant per les variacions espacials (al port i a la platja els percentatges de detecció eren d'un 90% a la majoria de mesos, disminuint gradualment a mesura que ens allunyàvem de la bocana); com temporalment (l'activitat bacteriana al desembre era inferior que a la resta, llevat de l'estació 18 on era igual per a tots els mesos). Aquests mapes mostraven també una certa estimulació de l'activitat bacteriana en zones pròximes a la línia de la costa, especialment a la costa oest de la badia (com per a exemple a l'agost, octubre i desembre del 2001).

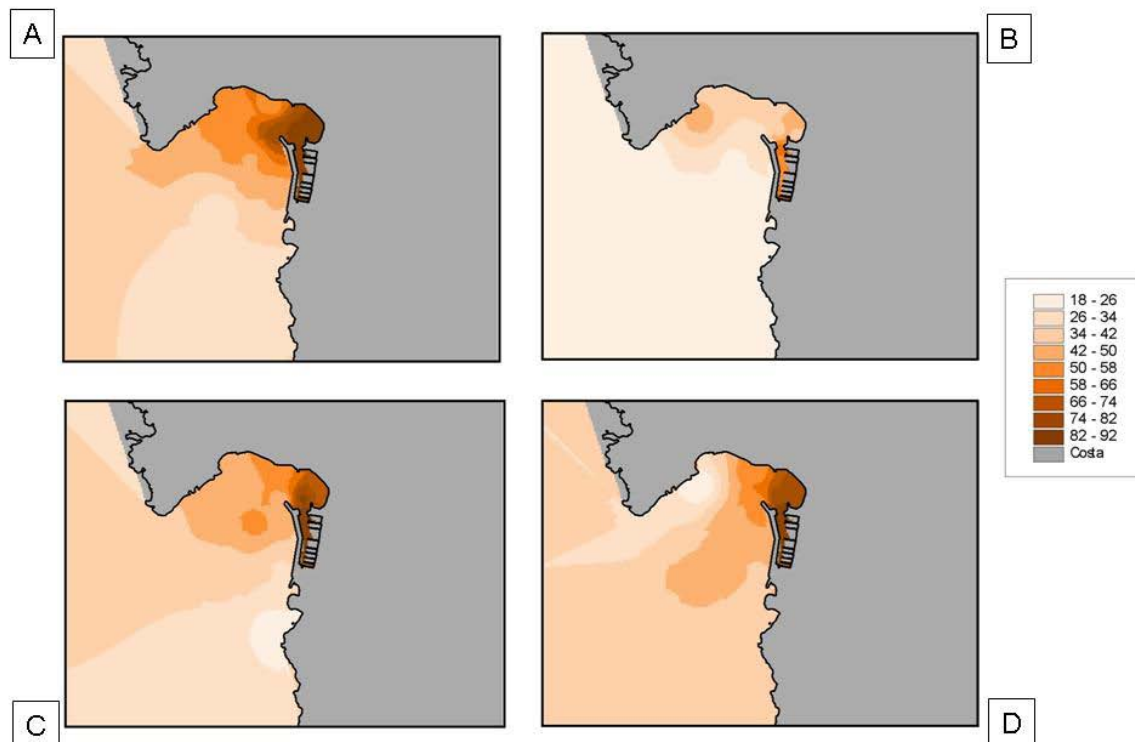


Fig.26: Variació espacial del percentatge de cèl·lules presumptament actives respecte al total de cèl·lules per alguns dels mesos analitzats mitjançant SIG. A: Agost 2001, B: Desembre 2001, C: Maig 2002 i D: Juliol 2002.

5. CORRELACIONS ENTRE ELS PARÀMETRES FÍSICOQUÍMICS I BIOLÒGICS ANALITZATS

Es realitzaren càlculs de correlacions no paramètriques entre els diferents paràmetres fisicoquímics per a així conèixer com interaccionaven entre ells a les diferents zones de l'àmbit d'estudi, a dins (est. 13, 14 i 16-18) o a fora del port (est. 5-12 i 15) (Taula 4). A dins el port, les correlacions més significatives de la temperatura eren amb la clorofil·la ($R=0,4$; $p<0,01$) i amb els compostos hidrofòbics ($R=-0,5$; $p<0,05$). En canvi, a fora del port la temperatura no presentava una correlació significativa amb la clorofil·la, encara que sí mantenia la correlació negativa amb els CH ($R=-0,3$). El pH a fora el port correlacionava significativament amb tots els altres paràmetres estudiats, coincidint el seu augment amb l'augment de la clorofil·la ($p<0,01$) i dels compostos hidrofòbics ($p<0,05$). Per altra banda, únicament el pH amb la salinitat tenia una correlació significativa de $p<0,01$ a dins el port. La salinitat presentava tant a dins com a fora una correlació positiva amb la temperatura tal i com s'esperava, l'augment d'aquesta produïa un augment de la salinitat, així i tot la significança a les mostres de la badia era major ($p<0,01$) que a dins el port ($p<0,05$).

La salinitat i la conductivitat presentaven elevades correlacions entre elles a dins i a fora del port, tal i com era d'esperar.

Taula 4: Correlacions no paramètriques entre els diferents paràmetres fisicoquímics analitzats.

DINS PORT						FORA PORT				
	Temperatura	pH	Salinitat	Conductivitat	Clorofil·la a	Temperatura	pH	Salinitat	Conductivitat	Clorofil·la a
Temp.	1					1				
pH	-0,3 ^a	1				-0,3 ^{**}	1			
Sal.	0,3 [*]	-0,4 ^{**}	1			0,3 ^{**}	-0,3 ^{**}	1		
Cond.	0,0	-0,1	0,7^{**}	1		0,0	-0,2 [*]	0,7^{**}	1	
Chla.	0,4 ^{**}	0,0	-0,1	0,1	1	-0,2	0,3 ^{**}	-0,1	0,2	1
CH	-0,5^{**}	0,3 [*]	-0,5^{**}	-0,3 ^{**}	0,0	-0,3 ^{**}	0,2 [*]	-0,1	-0,2 [*]	0,1

^a Les correlacions es calcularen segons la localització dels punts de mostreig, dins port: est. 5-12 i 15, fora port est. 13, 14 i 16-18. Els valors marcats amb un asterisc (*) tenen una significança estadística $0,05 < P < 0,01$ i els marcats amb dos (**) $P < 0,01$.

Aquestes diferències espacials tan destacables en les interaccions dels paràmetres fisicoquímics permetien, una vegada més, remarcar la zonificació que presentava l'àrea d'estudi en relació a l'aproximació a la zona portuària. Es detecta doncs una important caracterització de la zona de mostreig en base als factors (temperatura, salinitat, compostos hidrofòbics...) que influiran en l'estructura de les comunitats bacterianes.

Per tal de conèixer la relació existent entre les diferents mostres a partir de les característiques fisicoquímiques de l'aigua es realitzà un Anàlisi de Components Principals (PCA). L'anàlisi es basà en els paràmetres fisicoquímics determinats: temperatura, conductivitat, clorofil·la a, nombre de cèl·lules totals i concentració de compostos hidrofòbics. Aproximadament el 77% de la variabilitat de les dades es podia explicar amb tres components principals. Cada eix obtingut de l'anàlisi representava aquest percentatge de variabilitat caracteritzat per alguns dels paràmetres. L'eix PC1 explicava aproximadament el 31% de la variabilitat. Respecte a aquest eix les mostres s'ordenaven segons la concentració de clorofil·la i el nombre de cèl·lules totals, paràmetres que clarament discriminaven les mostres de la platja i del port (est. 13-18). L'eix PC2 explicava aproximadament un 25% de la variabilitat i el

PC3 el 21%, els quals correlacionaven majoritàriament amb la salinitat/conductivitat i la temperatura de l'aigua respectivament, indicatius doncs de la variabilitat estacional.

Capítol 2:

Estructura de les comunitats bacterianes a Port Adriano

Nogales, B., Aguiló-Ferretjans, M.M., Martín-Cardona, C., Lalucat, J., Bosch, R. Bacterial diversity, composition and dynamics in and around recreational coastal areas. Environ. Microbiol. 9(2007): 1913-1929

L'estructura de les comunitats bacterianes de l'àrea de mostreig de Port Adriano va ser caracteritzada mitjançant l'anàlisi de T-RFLP dels gens per 16S rRNA. Aquesta tècnica permet analitzar la diversitat total i l'estructura de comunitats microbianes de manera independent a les tècniques de cultiu. Les tècniques utilitzades van ser recolzades per l'anàlisi geogràfic (SIG) que permeté determinar la localització i abundància de les diferents poblacions bacterianes detectades a l'àrea geogràfica estudiada. Ambdues anàlisis caracteritzaren els diferents ambients provocats pels efectes del litoral i del seu ús a l'àrea de Port Adriano.

El total de mostres analitzades per T-RFLP varen ser 154, de les quals s'obtingueren 330 fragments de restricció terminal (T-RF) de 16S rDNA repartits entre els dos enzims de restricció *AluI* i *CfoI* i els extrems 5' i 3' de la següent manera: 109 T-RF *AluI* 5' (A5), 64 T-RF *AluI* 3' (A3), 112 T-RF *CfoI* 5' (C5) i 45 T-RF *CfoI* 3' (C3). D'aquests 330 fragments 141 presentaven una abundància relativa major a l'1% (47 T-RF A5, 21 T-RF A3, 49 T-RF C5 i 24 T-RF C3). Doncs més de la meitat dels fragments identificats tenien, en les diferents mostres on es detectaven, una abundància relativa inferior a l'1%.

1. DIVERSITAT GLOBAL DE LES COMUNITATS MICROBIANES ANALITZADES

La diversitat de les comunitats analitzades es va determinar mitjançant el càlcul de diferents índexs de diversitat. Els resultats s'obtingueren a partir dels T-RF detectats de l'extrem 5' dels 16S rDNA digerits amb l'enzim *AluI* (designats fragments A5, 109 fragments) perquè aquest extrem és més variable que l'extrem 3' i proporcionava una major resolució que els obtinguts amb l'enzim *CfoI*.

Es presenta, en primer lloc, el nombre de T-RF A5 detectats a cada estació per mes estudiat (Fig. 27). Les mostres del mes d'abril, a totes les estacions, eren les que presentaven major nombre de fragments, amb valors molt més elevats que la resta, quasi sempre superant els 30 fragments i en algunes estacions els 40. En canvi, a la majoria de les mostres es detectaven entre 10 i 25 fragments. El mes que presentava valors més baixos (<10), en general era el mes d'agost i el mes de gener a les estacions del port o influenciades per aquest.

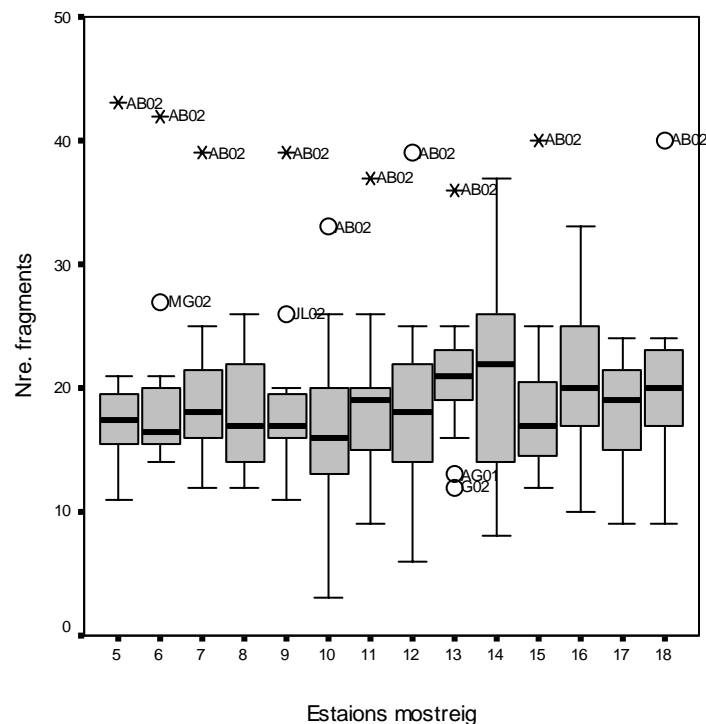


Fig.27: Nombre de TRF-5' amb l'enzim *AluI* per a cada estació de mostreig als mesos analitzats. Apareixen representats els valors de la mediana, els valors màxims i mínims i l'amplitud interquartil per a cada estació. ° valors atípics: majors o menors que 1,5 i 3 vegades la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 vegades la longitud interquartil.

D'altra banda es calculà l'índex de Shannon (H') per a cada una de les estacions durant els mesos de mostreig (Fig. 28). El més destacable dels resultats eren, també, els valors màxims d' H' obtinguts al mes d'abril per a totes les estacions (valors que oscil·laven entre 3 i 4), en molts de casos sent l'augment de diversitat molt superior a la resta dels mesos. Aquest augment de la diversitat es podria atribuir a l'augment del nombre de T-RF (Fig. 27).

Cal realçar que les estacions que presentaven una major diversitat eren les de dins el port (est. 18, 17 i 16) i les estacions 13 i 14, on la mediana dels valors superava el 2,5. La resta de les estacions, sobretot les més allunyades del port, presentaven rangs de variacions de valors molt més petits i valors més pròxims a 2. Entre aquestes s'incloïa l'estació 15 que a pesar d'estar situada molt pròxima a la bocana, presentava valors de diversitat que s'aproximaven a les mostres de la badia. L'estació 12 presentava una mitjana propera als valors de fora de la badia, però al mateix temps aquesta estació tenia un rang més elevat de variació que la resta de les estacions 5-11. Doncs, les estacions menys influenciades pel port i la seva activitat presentaven una diversitat menor que aquelles que es trobaven a dins el port i la seva àrea d'influència (Fig. 28).

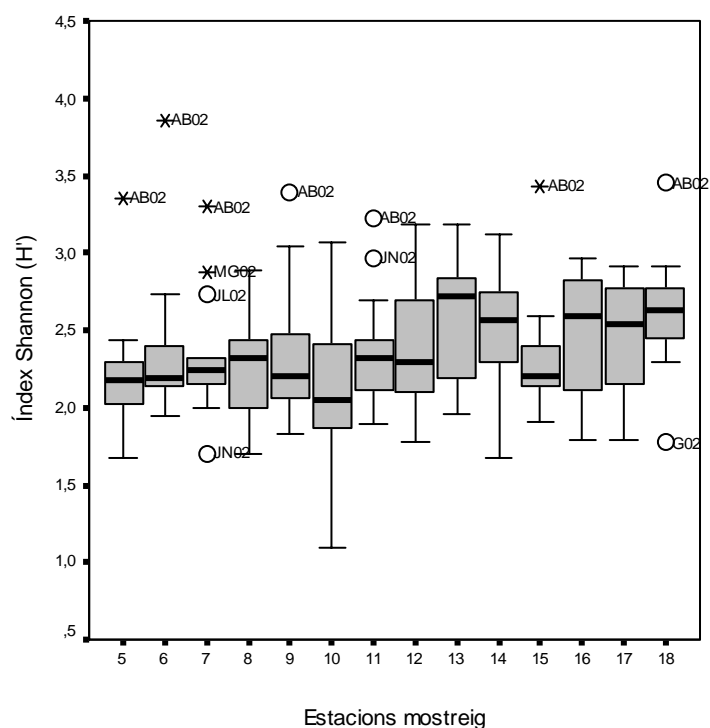


Fig.28: Índex de Shannon (H') calculat a partir dels T-RF 5' d'*Aul* per a cada estació de mostreig. ° valors atípics: majors o menors que 1,5 i 3 vegades la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 vegades la longitud interquartil.

Basat amb l'índex de Shannon, calculàrem l'índex de Lloyd i Ghelardi (J) que indica uniformitat o asimetria de la comunitat, informant de l'abundància relativa d'espècies a dins d'una comunitat. Representat a la Figura 29, presentava valors elevats entre 0,7 i 0,9. Les estacions de la 5 a la 11 i la 15 presentaven uns valors més baixos de J que a la resta de les mostres. Aquests valors augmentaven en les estacions situades a menys distància de la bocana del port 12, 13 i 14, al mateix temps que augmentava l'amplitud del rang. Finalment les tres estacions del port tenien uns valors lleugerament més elevats de J amb una amplitud interquartil menor. Així la uniformitat de la comunitat augmentava, a l'igual que la diversitat, coincidint amb l'aproximació i la localització de les estacions al port. També quedava reflectida la marcada diferència al mes d'abril amb l'augment de la uniformitat a moltes de les mostres. Cal destacar també la baixa uniformitat de les comunitats bacterianes als mesos de juny (2001 i 2002) a les estacions 5, 7 i 8 i a les de dins el port (est. 16, 17 i 18).

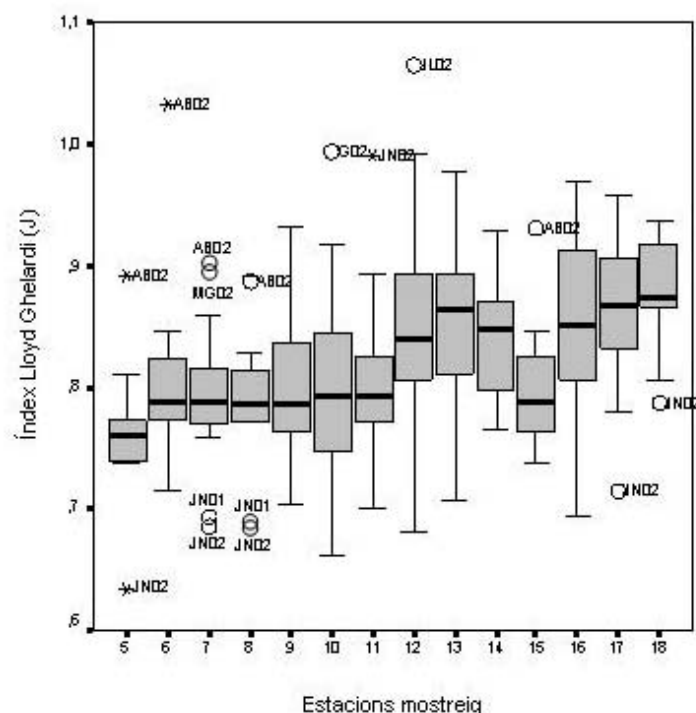


Fig.29: Índex de Lloyd i Ghelardi (J) calculat a partir dels T-RF 5' d'*AluI* per a cada estació de mostreig. ° valors atípics: majors o menors que 1,5 i 3 vegades la longitud interquartil; * valors extrems: superiors a 3 vegades la longitud interquartil.

2. ESTUDI COMPARATIU DE LA COMPOSICIÓ I ESTRUCTURA DE LES COMUNITATS BACTERIANES MARINES ESTUDIADAES MITJANÇANT L'ANÀLISI DE PERFILS DE T-RFLP DE 16S rDNA

Després de normalitzar les dades de fluorescència dels diferents perfils de T-RFLP de 16S rDNA i de procedir al seu alineament tal i com s'indica a l'apartat 4.5. de Materials i Mètodes, es va realitzar la comparació dels diferents perfils, el càlcul de similituds entre els mateixos i la representació en dendrogrames. Es calcularen diferents dendrogrames utilitzant diferents criteris, la topologia dels quals va ser comparada. A la Fig. 30 es representa el dendrograma obtingut mitjançant el mètode UPGMA, utilitzant el coeficient de Bray-Curtis per al càlcul de la matriu de distància. El dendrograma mostra els resultats dels perfils de les estacions analitzades als 14 mesos de mostreig a partir dels fragments corresponents als extrems 5' i 3' dels 16S rDNA obtinguts de les digestions realitzades amb els enzims de restricció *AluI* i *CfoI* (330 fragments en total). El dendrograma presentava dos grups clarament diferenciats amb una similitud menor al 30%: el **Grup I**, amb un menor nombre de mostres on apareixen majoritàriament mostres procedents de la zona del port (est. 18, 17 i 16) de pràcticament tots els mesos estudiats;

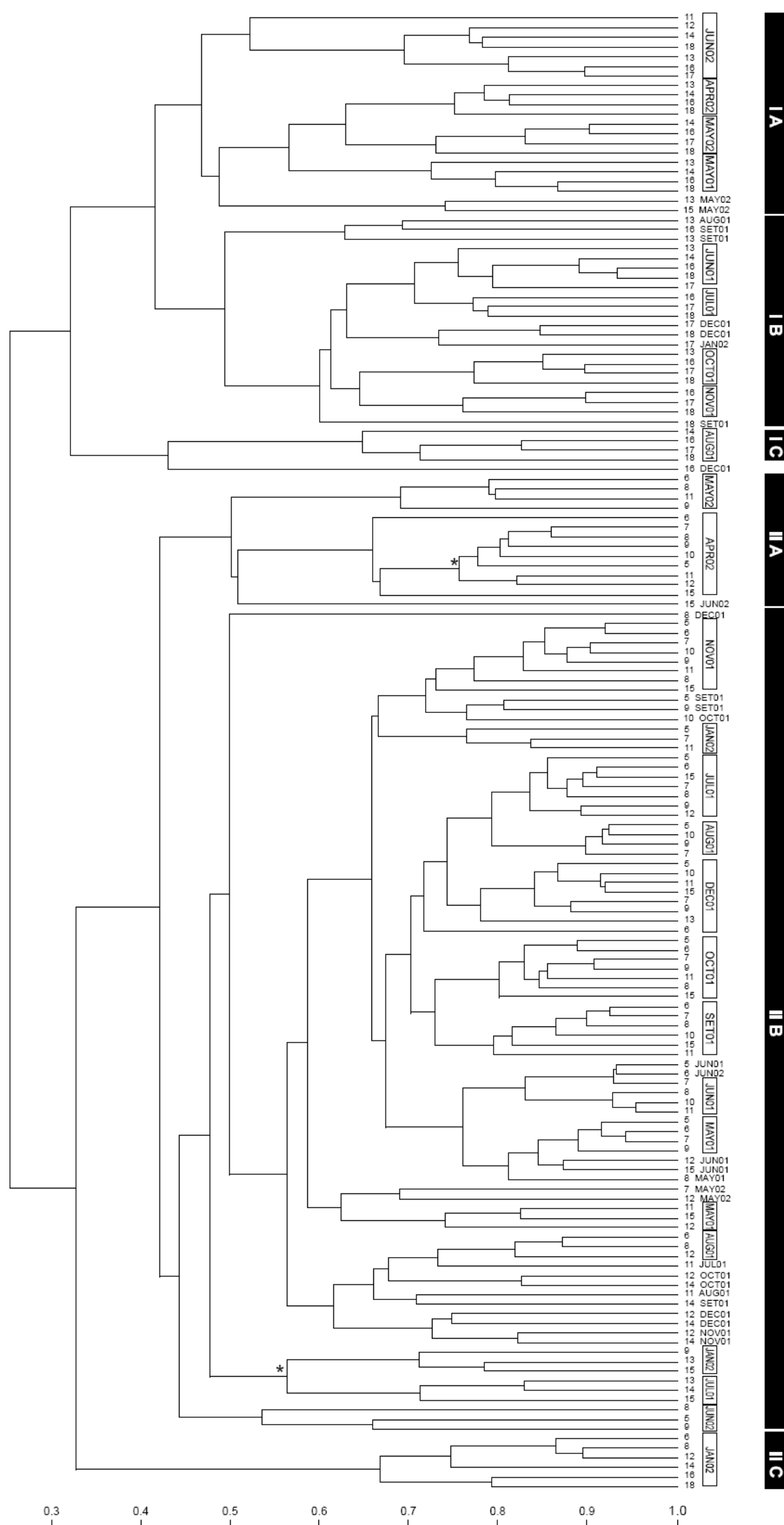


Fig.30: Dendrograma obtingut a partir dels perfils de T-RFLP de les mostres d'aigua analitzades. Els subgrups marcats amb asterisc (*) són els que canvien de posició quan el càlcul es realitza sense els T-RF amb una abundància menor a l'1%. La barra ens indica els valors de similitud entre els perfils.

i el **Grup II**, que agrupava els perfils de T-RFLP de 16S rDNA de la majoria de les mostres externes al port. Dins del denominat Grup I apareixien els perfils d'algunes mostres de les estacions 12, 13 i 14 molt pròximes a la bocana del port, principalment de mesos de temperatures més elevades: estiu, primavera i de la tardor més càlida (setembre i octubre). I puntualment apareixien l'estació 11 del mes de juny de 2002 i l'estació 15 de maig del 2002.

Les similituds dels perfils dins cadascun d'aquests dos grups principals (intragrup) eren lleugerament superiors al 30%, essent més elevades al Grup II. Dins de cadascun d'aquests grups es podien diferenciar varis subgrups. Així, i considerant com a límit un valor de similitud entre els perfils del 45% es van definir 3 subgrups en el Grup I (IA-IC) i 3 en el Grup II (IIA-IIC), que es descriuen a continuació. Els subgrups observats dins el Grup I moltes vegades es formaven segons els mesos en els que es realitzava el mostreig. El subgrup IA estava format únicament per mostres de primavera dels mesos abril, maig de 2001 i 2002 i juny del 2002. Tots els perfils del juny de l'any 2002 (llevat del de l'estació 15) presents al Grup I es trobaven agrupats amb similituds superiors al 50%. El subgrup IB contenia perfils de mostres de diferents mesos (estiu, tardor i hivern) amb valors de similitud entre ells del 60%, encara que mostrava una relació més propera entre perfils d'estiu i d'hivern a les mostres del port i una certa diferenciació amb les mostres de tardor. Dins aquest subgrup es trobava relacionat un petit grup de perfils dels mesos d'agost i setembre del 2001. Finalment, s'observà la formació d'un petit grup (subgrup IC) amb les estacions de port 16, 17 i 18 d'agost, que presentaven perfils diferenciats de la resta, relacionat amb una similitud menor del 45% amb l'estació 16 del mes de desembre (Fig. 30).

Aquestes dades indiquen que el conjunt de les poblacions bacterianes dins del port (est. 18, 17 i 16) es diferenciava molt de les poblacions detectades a la resta de les estacions, i que la influència d'aquest port sobre aquestes poblacions anava més enllà dels límits de la bocana en alguns dels mesos estudiats, de la primavera fins a l'estiu més avançat, constatat per la presència de estacions extra portuàries en aquest primer grup analitzat.

Al segon gran grup del dendrograma (Grup II) es trobaven principalment mostres de fora del port i entre aquestes es trobaven quasi totes les de l'estació 15, que com ja s'ha descrit anteriorment, presentava característiques més semblants a les mostres de la badia que a les del port i el seu voltant. Dins d'aquest grup de perfils destacava una vegada més una agrupació formada per mostres de primavera dels mesos d'abril, maig i juny de 2002 (Grup IIA) amb una similitud entre els perfils lleugerament superior al 50%.

El segon subgrup (IIB) contenia perfils de tot el període de mostreig, cal destacar dins aquest subgrup un agrupació de perfils majoritàriament de les estacions 12 i 14 properes al port corresponents a la tardor que no s'agrupaven amb el Grup I i que presentaven similituds superiors al 60%. Finalment, els perfils de gener de les mostres de port formaven un grup coherent, el subgrup IIC (similitud aproximada 65%) amb mostres també de gener d'estacions properes a la costa (est. 14, 12, 8 i 6), però que presentava una similitud relativament baixa (aproximadament del 35%) amb la resta de perfils del Grup II. Els paràmetres fisicoquímics del mes de gener presentaven algunes diferències (observat a partir de PCA) respecte als demés mesos que podrien haver influït en l'estructura diferencial de les poblacions bacterianes que explicaria l'agrupació que s'observa al dendrograma. A més de per presentar les temperatures més baixes dels mesos de mostreig (Fig. 13), el mostreig de gener es caracteritzà per tenir a moltes estacions els valors màxims de conductivitat (est. 6, 9, 10, 12-15 i 17; Fig. 16). També es detectaven valors elevats en les concentracions de compostos hidrofòbics a les estacions del port i voltants en aquest, molt més elevats que a les estacions de fora en el mateix mes i bastant més elevades respecte als demés mesos (Fig. 17).

Es calculà el mateix dendrograma havent aplicat una transformació logarítmica a les abundàncies relatives de tots els T-RF obtinguts. D'aquesta manera es donava major pes als T-RF que no presentaven unes abundàncies relatives rellevants i que presumptament correspondrien a poblacions bacterianes numèricament minoritàries. El resultat d'aquest dendrograma confirmà l'existència de dos grans grups de perfils diferenciats per la localització geogràfica a dins i fora del port. Es mantenia doncs l'estructura principal del dendrograma mostrat a la Fig. 30.

I finalment, per a considerar els T-RF que presentaven una major abundància relativa a les mostres analitzades, i que presumptament correspondrien a les poblacions bacterianes majoritàries, es calculà també un dendrograma únicament amb els T-RF que tenien una abundància relativa igual o superior a l'1% (141 T-RF). El dendrograma que s'obtingué presentava algunes variacions respecte al dendrograma calculat amb la totalitat dels T-RF (330 fragments) (dades no mostrades) però es seguia conservant la gran diferenciació dels dos grans grups de perfils (Grups I i II). Els principals canvis es produïren en quant a la posició al dendrograma de perfils corresponents al Grup II que formaven una nova agrupació dins el Grup I. Aquest nou subgrup estava format per perfils del mes d'abril d'estacions situades a fora del port i mostres de juliol (2001) i gener de les estacions més relacionades amb el port, estacions 13-15 (grups marcats amb un asterisc a la Fig.30). Aquest nou grup presentava una similitud amb la resta de subgrups

del Grup I del 45%, pel que podia constituir un nou subgrup. D'altra banda, les similituds intragrup entre perfils del Grup I eren més baixes que al dendrograma presentat a la Fig. 30.

Així doncs, es pot concloure que, el pes de l'agrupació dels perfils de T-RFLP de 16S rDNA, i per tant de les comunitats bacterianes a les mostres d'aigua, venia donat principalment per la seva localització geogràfica i no tant per l'època de l'any. Encara que hi havia associacions determinades pels mesos en que es realitzaven els mostrejos, aquestes sempre estaven supeditades a l'agrupació per estació de mostreig, és a dir, al seu posicionament geogràfic. Es podien així definir dos grans tipus de comunitats microbianes: (1) comunitats de port i zona d'influència (Grup I a la Fig. 30) i (2) comunitats de badia (Grup II a la Fig. 30). Els principals T-RF que contribuïen a la diferenciació dels dos tipus de comunitats es van determinar i les poblacions bacterianes representades per alguns d'aquests T-RF van ser identificades.

3. IDENTIFICACIÓ DE LES POBLACIONS BACTERIANES CORRESPONENTS A T-RF PREDOMINANTS ALS PERFILS DE T-RFLP DE 16S rDNA DE MOSTRES DE PORT ADRIANO

La identificació de poblacions bacterianes corresponents als principals T-RF observats als perfils de T-RFLP de 16S rDNA es va fer a partir de la realització de 6 genoteques de 16S rDNA amplificat de mostres de DNA total de les estacions de port, platja i badia (est. 18, est. 13 i est. 5) als mesos d'agost i desembre. La descripció detallada de la composició d'aquestes genoteques es presenta al Capítol 3 de resultats. S'obtingueren 703 clons, que s'agruparen segons els patrons d'RFLP obtinguts de la digestió dels enzims *AluI* i *CfoI* i es seleccionà un total de 76 clons representatius (apartat 5, Materials i Mètodes). Aquests clons representants van ser analitzats per T-RFLP i caracteritzats per la mida dels 4 T-RF, corresponents als extrems 5' i 3' del 16S rDNA digerits amb els enzims *AluI* i *CfoI*. Es considerà que al menys 3 d'aquests 4 T-RF havien de detectar-se als perfils de les mostres ambientals i tenir una abundància relativa similar per a determinar que la població identificada pel clon es trobava als perfils de T-RFLP d'alguna de les estacions de mostreig.

La Figura 31 representa les abundàncies relatives i presència dels T-RF predominants i la seva identificació presumptiva. La representació dels T-RF A5 es majoritària perquè aquests eren els fragments que proporcionaven una major discriminació. Les diferències en la composició entre les mostres de la badia i les zones

pròximes a la costa eren a causa de la presència de determinats T-RF en aquestes zones (platja i port) que no s'observaven a les mostres de la badia (p.e. *Bacteroidetes* T-RF A5-198,0 i *γ-Proteobacteria* T-RF A5-170,3) i viceversa (p.e. SAR11 T-RF A5-172,2), a l'igual que les variacions en les abundàncies relatives de T-RF que es trobaven a totes les mostres. Alguns T-RF s'observaren a ambdós tipus de mostres (badia i costa) amb abundàncies similars, com per exemple els T-RF A5-201,5; A5-194,9 i A5-164,3. La transició de les comunitats bacterianes de les mostres de les zones menys antropogenitzades a les que rebien un major impacte ambiental era gradual. Així, l'estructura de les comunitats bacterianes a les estacions 12 i 15 eren més semblants a les de les mostres de la badia. En canvi, a les estacions 13 i 14 la presència i l'abundància relativa dels T-RF observats a la badia disminuïen considerablement mentre augmentaven els T-RF característics de les mostres del port. Es podien definir doncs, quatre tipus de comunitats bacterianes: la del port (est. 16-18), la de la badia (est. 5-11) i dues zones de transició que serien la zona de la platja (est. 13 i 14) i una zona propera a aquesta però amb menor grau d'impacte (est. 12 i 15). Aquesta diferenciació es veia recolzada mitjançant l'Anàlisi de Similitud (ANOSIM) amb nivells de significació alts (valor $R=0,56$, $p=0$, diferències intragrup no significatives).

Aquells T-RF que eren més abundants i/o més freqüents als Grups I i II o ambdós, van ser seleccionats i designats com a predominants als perfils. Algunes de les poblacions bacterianes representades per aquests T-RF predominants van poder ser identificades per inferència a partir dels T-RF determinats per clons. Els T-RF identificats eren compatibles amb importants grups de bacterioplàncton marí, encara que es trobaven diferències entre les poblacions de les mostres de la badia amb les zones més impactades, platja i port. A la zona de la badia predominaven les poblacions bacterianes afiliades a la classe *α-Proteobacteria* i es trobaven baixes abundàncies de poblacions pertanyents a grups de *γ-Proteobacteria* i *Bacteroidetes*. A la Figura 32 es representa l'abundància relativa dels grups filogenètics més importants inferits en les quatre zones diferencials de Port Adriano. Les abundàncies relatives de poblacions d'*α-Proteobacteria* disminuïen amb l'aproximació a les àrees de major impacte (port i platja) així com augmentaven les poblacions de *γ-Proteobacteria* i *Bacteroidetes*. Aquestes diferències en abundància relativa eren significatives ($p<0,01$, Mann-Whitney and Wilcoxon tests) quan es comparaven les mostres de la badia i les pertanyents a zones de baix impacte (est. 5-12 i 15) per una banda amb zones d'alt impacte (est. 13, 14, 16-18).

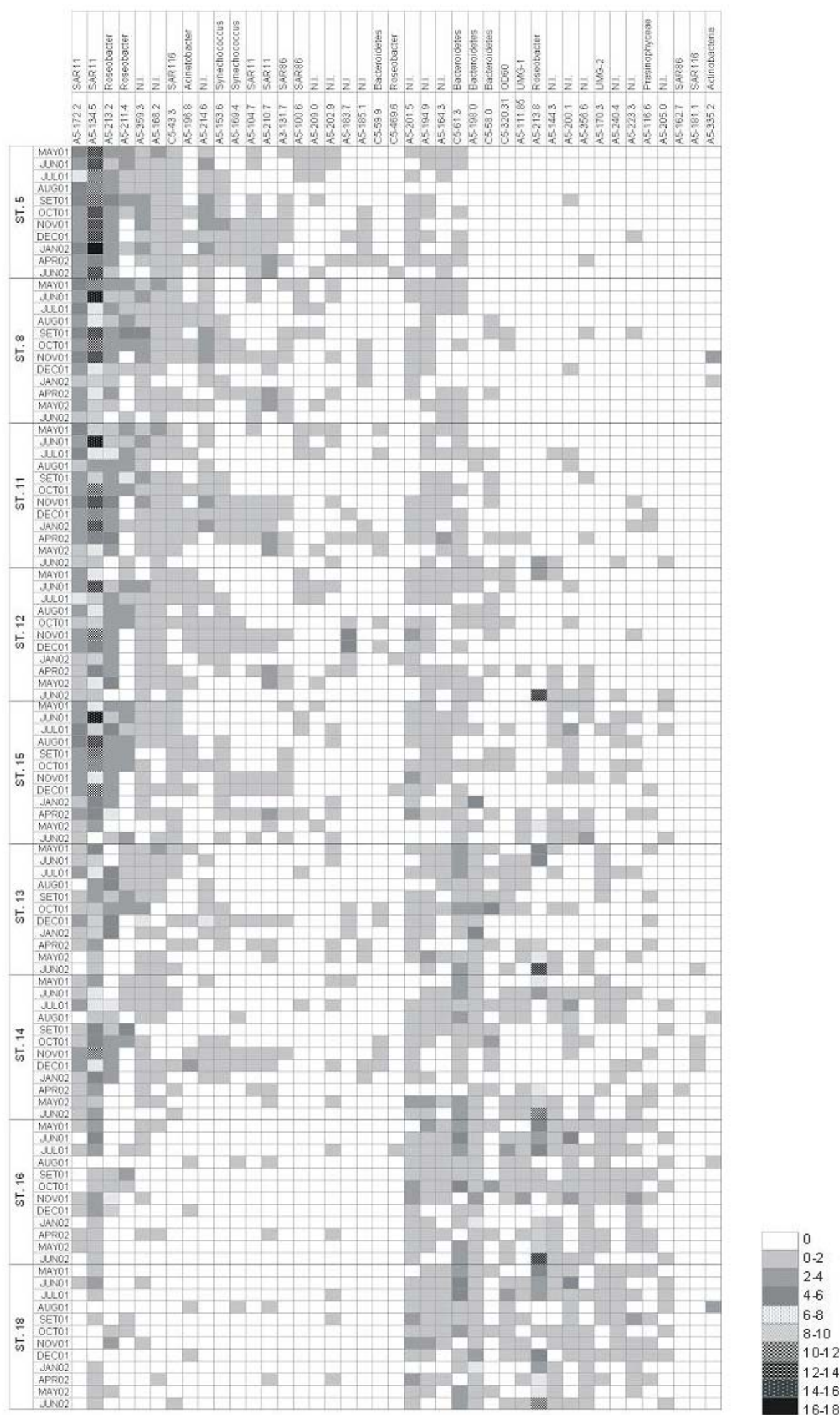


Fig.31: Representació de les abundàncies relatives dels T-RF predominants en les diferents estacions de mostreig i els diferents temps. Tan sols 3 estacions de la badia i 2 del port es varen seleccionar per a representar aquestes dues àrees. T-RF estan descrits per la mitjana de la mida de fragment (nt) precedit per una lletra corresponent a l'enzim de restricció (A per *Alu* I i C per *Cfo* I) i un número que indica si el T-RF correspon a l'extrem 5' o 3' de 16S rDNA. La gradació de grisos representa la fluorescència relativa (%). N.I. no identificats.

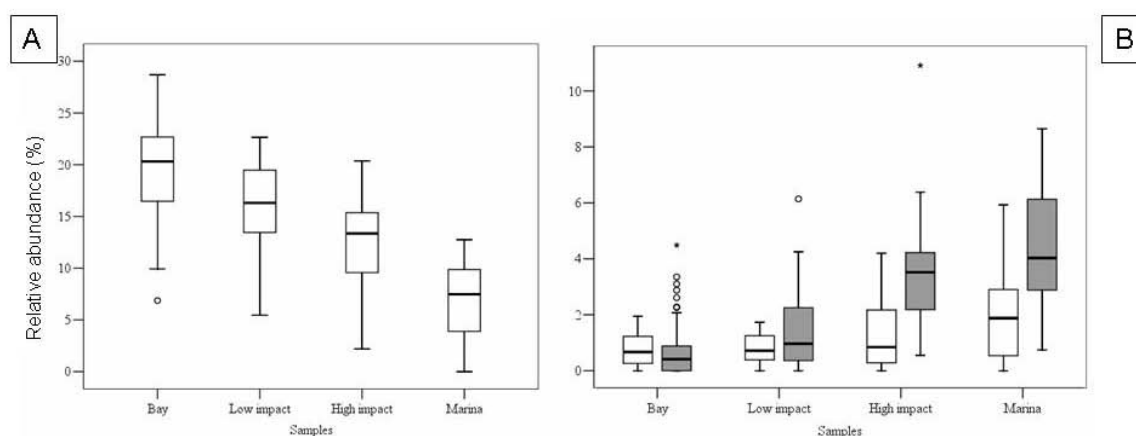


Fig.32: Abundàncies relatives de A: α -Proteobacteria i B: γ -Proteobacteria i Bacteroidetes (en blanc i gris, respectivament) identificades a les 4 zones de Port Adriano diferenciades. Bay: Badia (5-11), Low impact: zona de baix impacte (12 i 15), High impact: zona d'alt impacte (13 i 14) i Marina: port (16-18).

Dins les mostres de la badia, els T-RF més abundants i freqüents identificats corresponien a tres grups de la classe α -Proteobacteria (Fig. 31): 4 poblacions diferents de SAR11, 2 poblacions del grup *Roseobacter* i una població de SAR116. Altres bacteris identificats a les mostres de la badia varen ser SAR86 i una possible població d'*Acinetobacter* de la classe γ -Proteobacteria. També es detectaren fragments relacionats amb cianobacteris marins, *Synechococcus*. Els fragments identificatius de les poblacions de SAR116 i SAR86 no es van trobar a les mostres del port; a l'igual que els fragments relacionats amb una de les poblacions de SAR11 (A5-104,7) ni els fragments d'una de les poblacions de *Synechococcus* (A5-153,6). Encara que sí es trobaren poblacions de SAR86 a mostres de platja (est. 13 i 14). En general, els bacteris relacionats amb el grup de Bacteroidetes van ser més abundants a les mostres de la platja i del port, però dues poblacions (C5-61, 3 i C5-59,9) pertanyents a aquest grup filogenètic es trobaren a mostres de la badia i una d'aquestes (C5-59,9) mai es detectà al port.

La població més abundant detectada a les mostres de port pertanyia a un membre del grup *Roseobacter* (A5-213,8), el qual també s'observava a la platja (Fig. 31). Aquesta era l'única població pertanyent a α -Proteobacteria detectada a la zona del port, i molt probablement es tractaria d'una població diferent a les poblacions de *Roseobacter* detectades a la badia com es va confirmar per anàlisi de seqüències (Capítol 3 de Resultats). Altres poblacions predominants observades a les zones del port i de la platja corresponien a grups no cultivats de la classe γ -Proteobacteria: el T-RF A5-111,9,

relacionat amb seqüències de bacteris no cultivats detectats a aigües costaneres de Georgia (denominada UMG-1 en la Fig. 31); el T-RF A5-170,3 relacionat amb un clon obtingut d'aigua del Mediterrani (Schäfer *et al.*, 2000) i denominada UMG-2 a la Fig. 31, i el T-RF C5-320,2, relacionat amb bacteris marins oligotròfics del grup OM60 (Cho i Giovannoni, 2004). El primer d'aquests T-RF s'observava també en algunes ocasions a mostres de la badia.

Del grup *Bacteroidetes* es detectaren al menys tres poblacions més, cada una d'elles presentava distribucions espacials diferents. La població caracteritzada per C5-61,3 va ser detectada al llarg de tota l'àrea de mostreig, encara que la seva abundància augmentava amb l'aproximació a la platja i al port. El fragment A5-197,9 presentava una distribució molt semblant a l'anterior però amb la diferència que aquesta població només es detectava a les estacions de la badia més properes a les zones d'impacte. La població de *Bacteroidetes* amb T-RF C5-57,9 era més abundant i freqüent a les mostres de platja i la seva àrea d'influència (est. 13 i 14).

Una altra de les característiques de les mostres del port i de la platja era la presència de T-RF corresponents a plastidis d'algues piceucariotes de la classe *Prasinophyceae*, els quals eren difícilment observables a les mostres de la badia. L'altra presència de fotòtrofs era una població de *Synechococcus* que es detectava a les mostres de port tan sols al mes d'agost (A5-169,4). El darrer grup bacterià identificat a les mostres del port pertanyia a la classe *Actinobacteria*, però aquests T-RF s'observaven esporàdicament i no es relacionaven amb bacteris marins, pel que s'assumia que eren bacteris de procedència al·lòctona.

4. DISTRIBUCIÓ ESPACIAL DE POBLACIONS BACTERIANES DETECTADES A PORT ADRIANO

Amb l'aplicació de tècniques de Sistemes d'Informació Geogràfica (SIG) i l'elaboració de mapes d'abundància s'analitzaren les distribucions a tota la superfície de mostreig de cinc poblacions identificades.

El comportament espacial de la població de SAR11 caracteritzada per l'abundància mitjana del T-RF A5-134,5 presentava una disminució gradual amb l'aproximació a la zona portuària (Fig. 33, A i B). A les estacions 13 i 14, com es pot veure al diagrama de caixes, presentava una abundància menor en comparació a la resta de les estacions de la badia però sense arribar als límits dels valors de dins el port. Les poblacions

bacterianes en aquesta zona (est. 13 i 14), igualment que els paràmetres fisicoquímics descrits en el capítol anterior, la caracteritzaven com a àrea limítrof entre badia i port.

L'altra població de SAR11 identificada amb el T-RF A5-172,2 (Fig. 33, C i D) presentava una variació d'abundàncies molt semblant a l'anterior, disminuint considerablement amb l'aproximació a la zona portuària. Al mapa es pot constatar la similitud d'aquestes poblacions amb la disminució de l'abundància a les estacions de dins el port. L'única diferència eren els valors d'abundància relativa molt més elevats a la població de SAR11 A5-134,5.

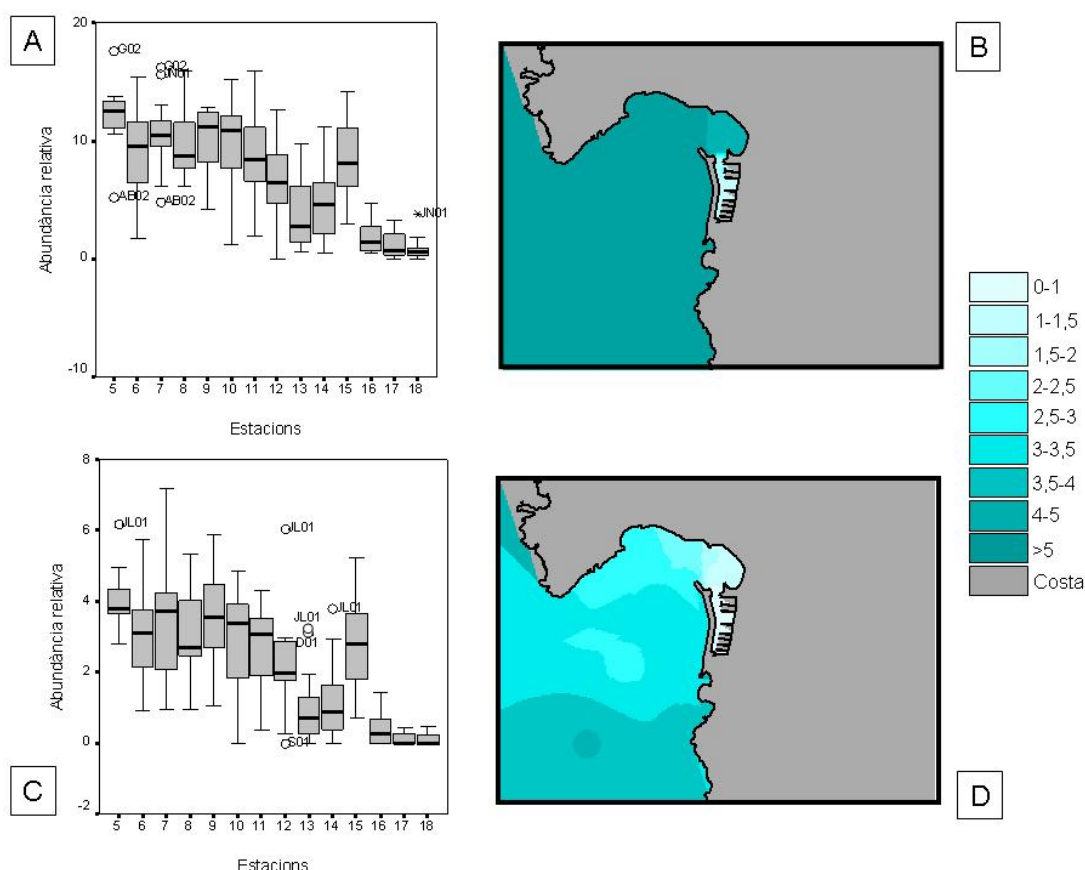


Fig.33: Representació de l'abundància relativa de dues poblacions de SAR11; A i C: Diagrama de caixes de T-RF A5-134,5, i T-RF A5-172,2 respectivament. B i D: Localització geogràfica de les poblacions T-RF A5-134,5 i T-RF A5-172,2, respectivament, determinades a partir dels valors promitjos per a cada estació.

La població representada per T-RF A5-211,4 associada a *Roseobacter* (Fig. 34 A i B), a l'igual que les poblacions de SAR11, presentava una major abundància a la zona de la badia, arribant a ser pràcticament nul·la la presència d'aquesta població a dins el port.

En canvi, la població de *Roseobacter* representada a la Fig. 34 C i D per l'abundància relativa de T-RF A5-213,2, presentava uns valors més elevats (mediana) a la zona de la badia amb una variació de rang molt petit. En canvi, el rang de variació en els valors d'abundància d'aquesta població anava augmentant a partir de l'estació 11, apropant-se a la bocana del port. El més remarcable de la dinàmica d'aquesta població era la seva abundància a l'estació 13, la qual presentava la mediana més elevada de les estacions i el valor màxim dins el seu rang.

La darrera població del grup *Roseobacter* analitzada representada pel T-RF A5-213,8 (Fig. 34 E i F), presentava un comportament oposat a les poblacions fins ara descrites, ja que la seva major abundància es detectava a les estacions portuàries. No només això, sinó que, l'aparició d'aquesta població a la badia era gairebé anecdòtica (Fig. 34 E). A la representació geogràfica a la imatge de la Fig. 34 F es veu, a més de la seva predominança dins el port, la gradació de la disminució d'aquesta població quan augmentava la distància a la bocana.

5. DINÀMICA TEMPORAL DE LES POBLACIONS BACTERIANES PREDOMINANTS. INTERACCIONS ENTRE LES ABUNDÀNCIES D'AQUESTES POBLACIONS I ELS PARÀMETRES AMBIENTALS.

Al llarg d'aquest estudi s'ha observat que a més de la dinàmica espacial determinada, existeixen variacions temporals de les poblacions bacterianes estudiades. Així a la Fig. 31 s'observaren variacions amb l'abundància i la detecció de certes poblacions en diferents èpoques del mostreig. Els canvis temporals en les abundàncies de T-RF es presentaven a ambdós grups (I i II) diferenciats al dendrograma (Fig. 30), però aquestes variacions eren més irregulars a les mostres de dins el port que a les mostres de la badia. Així, cap dels T-RF predominants a la platja o al port eren detectats amb elevades abundàncies al llarg de tot el període de mostreig, mentre que a les mostres de la badia s'observaven els T-RF A5-134,5 i T-RF A5-172,2 (SAR11) presents a tots els mesos analitzats. En canvi, el fragment més abundant a les zones de major impacte, T-RF A5-213,8 (*Roseobacter*), disminuïa considerablement a l'estiu i a la tardor i augmentava a l'hivern i a la primavera.

A la Figura 35 es presenta la variabilitat temporal que afectà a 4 de les poblacions més rellevants d'aquest estudi: SAR11 (T-RF A5-134,5) i *Roseobacter* (T-RF A5-211,4,

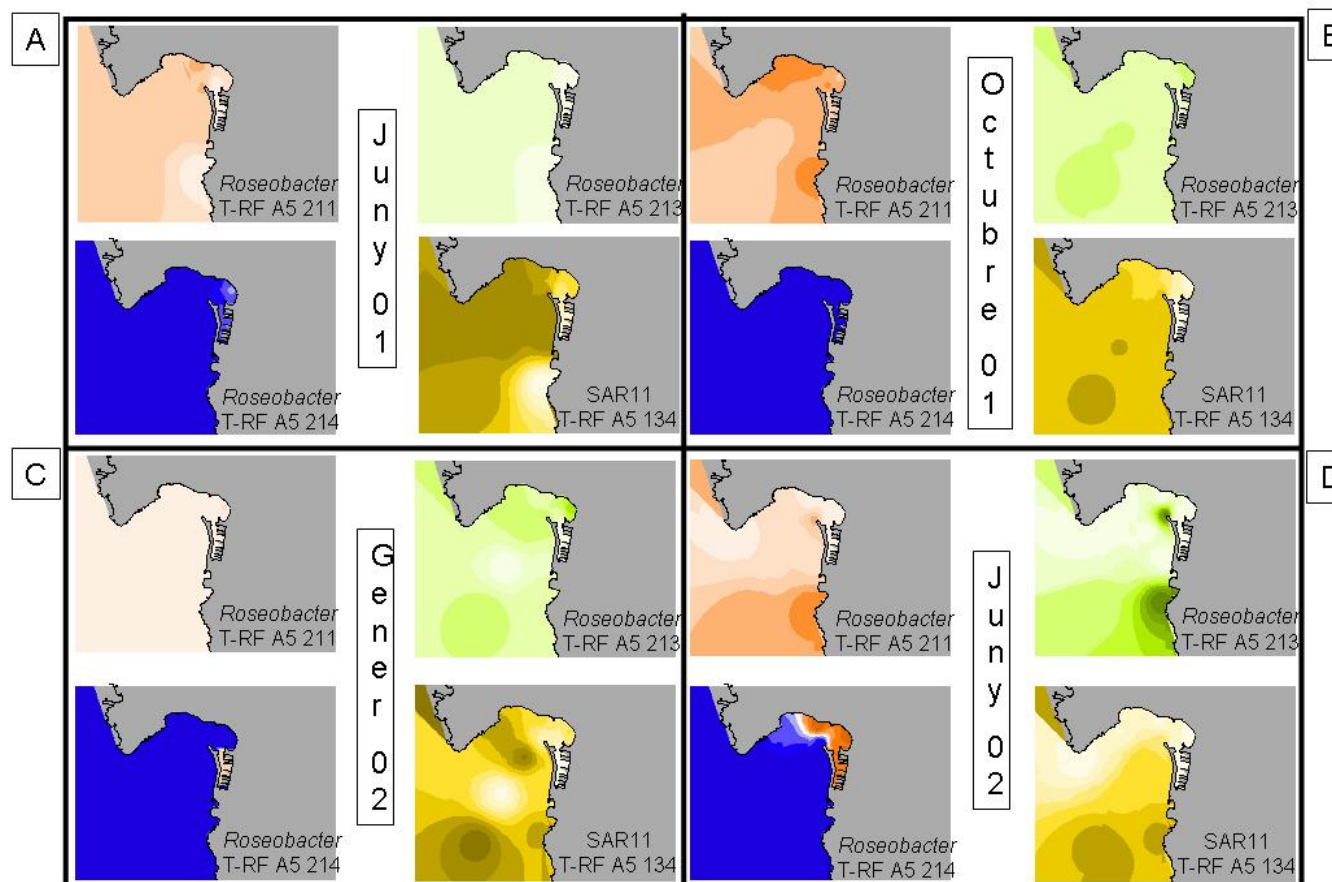


Fig.35: Variabilitat temporal de l'abundància relativa de les poblacions de *Roseobacter* A5-211,4 (211), A5-213,2 (213) i A5-213,8 (214) i SAR11 A5-134,5 (134) els mesos A: juny 2001, B: octubre 2001, C: gener 2002 i D: juny 2002. L'augment del color indica l'augment de les abundàncies de les poblacions, la població T-RF 213,8 presenta els valors mínims amb l'escala de blaus i els màxims amb l'escala de vermells, el blanc indica valors intermedis.

A5-213,2 i A5-213,8). El més destacable era l'homogeneïtat de l'abundància de SAR11 a l'estació 5 als quatre mesos presentats (juny 2001, octubre 2001, gener 2002 i juny 2002) a diferència de la variabilitat que presentaven les poblacions de *Roseobacter* a les estacions més pròximes a la costa. La població de *Roseobacter* identificada amb el fragment A5-211,4 presentava una disminució molt important de la seva abundància al mes de gener. La població de *Roseobacter* A5-213,8 presentava una baixa abundància als mesos del 2001, mentre que al 2002 la detecció a dins el port i a la platja era abundant i localitzada. L'aplicació dels SIG permeté identificar comportaments semblants entre les poblacions al mateix mes, per exemple la desaparició de les poblacions tant de *Roseobacter* com SAR11 a l'estació 9, així com l'abundant detecció a la mateixa estació el juny 2002. Això també permet destacar la important variabilitat interanual de les poblacions bacterianes estudiades.

Les correlacions no-paramètriques calculades entre l'abundància relativa dels T-RF predominants i els paràmetres ambientals mesurats, permeteren un estudi més detallat de les poblacions en relació al temps. Aquestes correlacions es presenten a la Taula 5.

El període de mostreig permet la comparació en dos mesos, maig i juny, entre dos anys consecutius, 2001 i 2002, de les abundàncies d'alguns dels T-RF predominants. Així es pot analitzar la variació interanual d'aquestes poblacions. Per a moltes de les poblacions predominants detectades hi havia diferències significatives en abundància els dos anys de mostreig. L'abundància de 2/3 parts dels T-RF predominants estaven correlacionats significativament amb el pH, la salinitat i la conductivitat, aquests paràmetres es presentaven significativament diferents a les dues primaveres analitzades (del 2001 i del 2002). La variació interanual es produïa degut a la disminució de l'abundància dels T-RF a les mostres de l'any 2002, amb l'excepció de la població de SAR11 a les mostres de la badia (T-RF A5-210,7) i la població de *Roseobacter* al port i a la platja (T-RF A5-213,8), ambdues augmentaven al llarg de la primavera del 2002.

La temperatura era un important factor d'influència en les dinàmiques temporals de les poblacions en aquesta àrea, així l'abundància de la majoria de T-RF estava correlacionada significativament amb la temperatura (Taula 5). T-RF associats a bacteris pertanyents al mateix grup filogenètic presentaven relacions oposades amb aquest paràmetre, com per exemple les poblacions de SAR11, *Roseobacter* i SAR86 a les mostres de la badia i *Bacteroidetes* a les mostres del port. Això indicà que existia una

Taula 5: Valors de les correlacions entre l'abundància de les poblacions presumptivament identificades i els paràmetres ambientals determinats.

T-RF	Localització	Identificació	Coeficient de correlació Spearman ^{a, b}						Variació interanual ^c
			Temperatura	pH	Salinitat	Conductivitat	Clorofil·la	OG	
A5-134,5	Badia	SAR11	n.s.	n.s.	-0,31	-0,31	n.s.	n.s.	p<0,01
A5-172,2	Badia	SAR11	0,22*	n.s.	-0,23*	-0,32	n.s.	-0,22*	p<0,01
A5-104,7	Badia	SAR11	-0,55	n.s.	-0,31	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A5-210,7	Badia	SAR11	-0,69	-0,24*	n.s.	0,48	n.s.	0,27	p<0,01
A5-211,4	Badia	<i>Roseobacter</i>	0,62	0,28	-0,30	-0,62	n.s.	n.s.	p<0,01
A5-213,2	Badia	<i>Roseobacter</i>	-0,43	n.s.	-0,21*	n.s.	n.s.	-0,22*	n.s.
C5-43,3	Badia	SAR116	0,33	-0,25*	n.s.	n.s.	-0,22*	n.s.	p<0,01
A3-131,7	Badia	SAR86	-0,37	n.s.	-0,33	-0,22*	n.s.	n.s.	n.s.
A5-100,6	Badia	SAR86	0,31	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
A5-196,8	Badia	<i>Acinetobacter</i>	n.s.	n.s.	-0,42	-0,29*	n.s.	n.s.	n.s.
A5-153,6	Badia	<i>Synechococcus</i>	-0,39	0,41	-0,34	n.s.	0,34	0,23*	n.s.
A5-169,4	Badia	<i>Synechococcus</i>	-0,52	n.s.	-0,26*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C5-59,9	Badia	<i>Bacteroidetes</i>	-0,41	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C5-61,3	Badia	<i>Bacteroidetes</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,05>p>0,01
A5-134,5	Port	SAR11	n.s.	0,34*	-0,37	n.s.	-0,50	0,33*	p<0,01
A5-172,2	Port	SAR11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,72	n.s.	p<0,01
A5-213,8	Port	<i>Roseobacter</i>	n.s.	-0,48	0,58	0,51	n.s.	n.s.	p<0,01
C5-320,3	Port	OMG	0,59	n.s.	n.s.	-0,37	0,50	n.s.	p<0,01
A5-111,9	Port	ODIII6	0,46	-0,45	n.s.	-0,33*	n.s.	n.s.	n.s.
A5-170,3	Port	MED	0,43	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,01
C5-58,0	Port	<i>Bacteroidetes</i>	n.s.	n.s.	-0,29*	-0,30*	-0,37	n.s.	n.s.
C5-61,3	Port	<i>Bacteroidetes</i>	0,39	n.s.	n.s.	n.s.	0,46	n.s.	n.s.
A5-198,0	Port	<i>Bacteroidetes</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A5-153,6	Port	<i>Synechococcus</i>	-0,37	0,50	n.s.	n.s.	-0,36	0,28*	n.s.
A5-169,4	Port	<i>Synechococcus</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A5-116,6	Port	<i>Prasinophyceae</i>	-0,42	n.s.	-0,29*	n.s.	-0,28*	n.s.	n.s.

a: Les correlacions es calcularen per separat, considerant les dues principals zones espacials: mostres de la badia (est. 5-12 i 15) i les mostres de la platja i el port (est. 13-14 i 16-18).

b: Significació estadística: n.s.: $p>0,05$; *: $0,05>p>0,01$; sense indicació: $p<0,01$.

c: Tests de Mann-Whitney i Wilcoxon.

successió de poblacions relacionades en aquestes mostres, algunes de les quals eren més abundants als mesos més càlids mentre que d'altres predominaven als mesos de baixes temperatures. La variació temporal de l'abundància del grup d'*α-Proteobacteria* a les mostres de la badia (Fig. 36) és un clar exemple de la successió entre poblacions relacionades. Dues poblacions de SAR11 (A5-134,5 i A5-172,2), una població de *Roseobacter* (TRF A5-213,2) i una població de SAR116 es presentaren al llarg del període de mostreig. En canvi, la població de *Roseobacter* T-RF A5-211,4 va ser observada només fins el novembre de 2001 i la seva desaparició a la badia coincidia amb l'aparició de la població de SAR11 T-RF A5-210,7. La correlació entre aquests dos T-RF era significativa i negativa ($R = -0,82$, $p < 0,01$). Finalment, la població de SAR11 A5-104,7 tan sols s'observava, amb baixes abundàncies, als mesos de tardor i hivern.

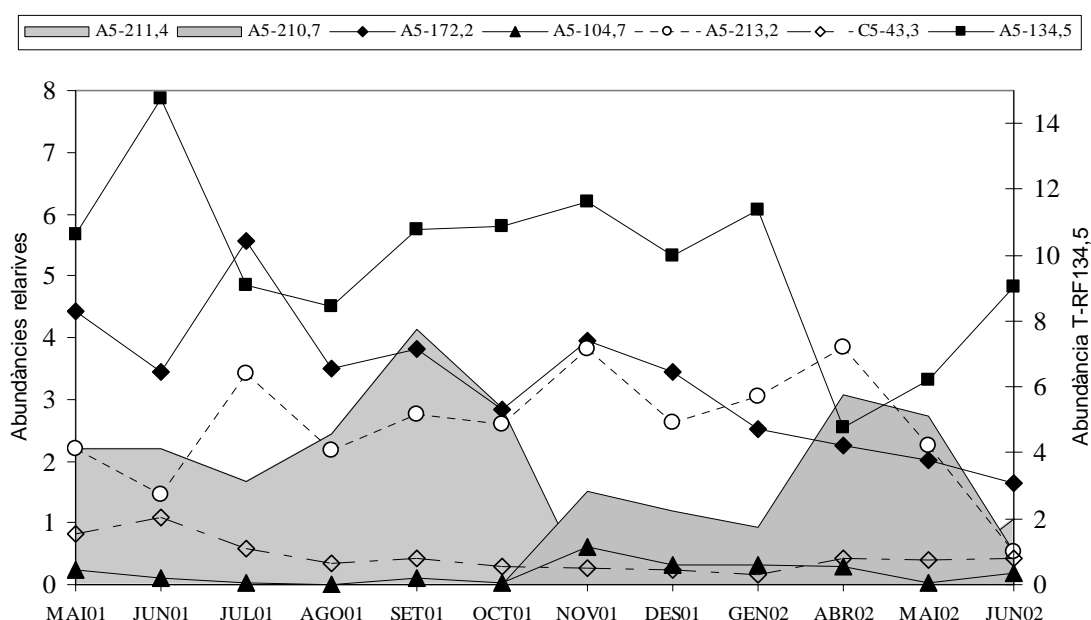


Fig.36: Variació temporal de les abundàncies mitjanes de les diferents poblacions *α-Proteobacteria* (SAR 11: A5-210,7, A5-172,2, A5-104,7 i A5-134,5; SAR116: C5-43,3 i *Roseobacter*: A5-211,4 i A5-213,2) detectades a la badia.

L'abundància de les poblacions fotosintètiques presentaven també variacions temporals. Les poblacions de *Synechococcus* a les mostres de la badia augmentaven als mesos de tardor. També als mesos d'hivern les algues picoplanctòniques associades a *Prasinophyceae* es detectaven a perfils d'algunes de les mostres de la badia (T-RF A5-116,6). L'abundància de la majoria de les poblacions de *Synechococcus* predominants a la badia (T-RF A5-153,6) es correlacionava positivament amb la concentració de clorofil·la detectada ($Rho = 0,34$, $p < 0,01$), el que podria indicar que aquesta població era

en part responsable dels canvis en la concentració del pigment en aquestes mostres. La dinàmica de les poblacions fotòtrofes en les mostres de la platja i del port era també més irregular que en les mostres de la badia. Encara que les poblacions de *Synechococcus* augmentaven al període tardor-hivern, hi havia un pic màxim d'abundància de TRF A5-169,4 a l'agost. Les picoalgues pertanyents al grup *Prasinophyceae* s'observaren amb molta variabilitat en el període de mostreig, sent més abundant al setembre i al novembre (Fig. 37). Cap de les poblacions fotosintètiques observades a la platja i al port presentaven una correlació significativa positiva amb les concentracions de clorofil·la, indicant que mitjançant les tècniques de T-RFLP no es detectaren les poblacions més importants d'organismes fotòtrofs en aquestes zones.

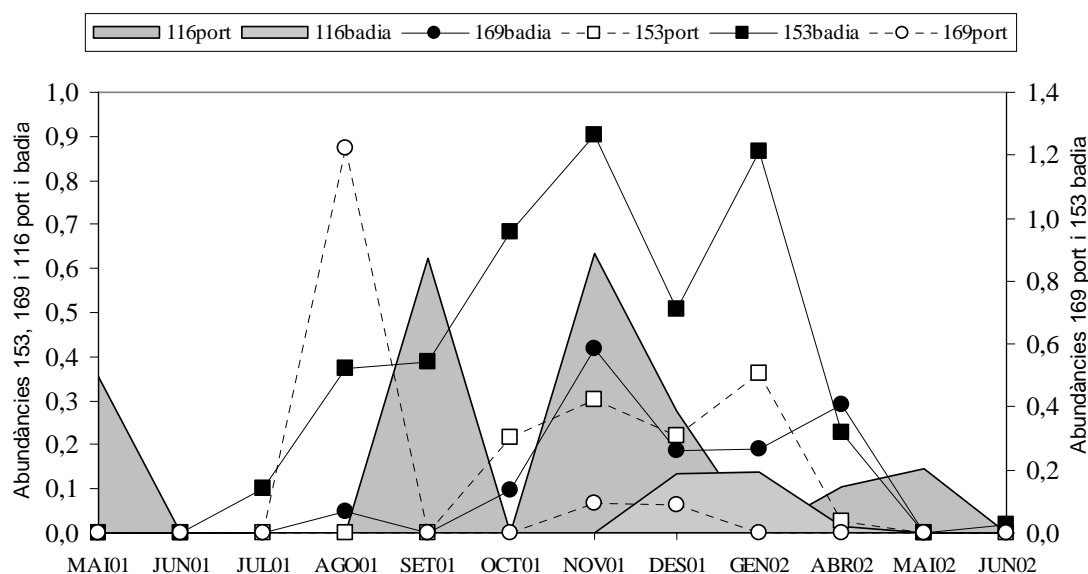


Fig.37: Abundàncies mitjanes de les diferents poblacions fotòtrofes (*Cyanobacteria* A5-169,4 i A5-153,6 i algues picoeucariotes A5-116,6) detectades al port i a la badia.

Les poblacions bacterianes que sí presentaven una correlació significativa positiva amb clorofil·la *a* al port i la platja eren els organismes no cultivats de la subclasse *γ-Proteobacteria* T-RF C5-320,3 i la població de *Bacteroidetes* T-RF C5-61,3. Les dues principals poblacions de SAR11 (TRF A5-134,5 i A5-172,2) presentaven una correlació significativa negativa amb la concentració de clorofil·la a les zones de major influència antròpica (Taula 5). Finalment, hi havia algunes poblacions feblement relacionades amb la concentració de compostos hidrofòbics.

Capítol 3:

Anàlisi filogenètica de les comunitats bacterianes a Port Adriano

Aguiló-Ferretjans, M.M., Bosch, R., Martín-Cardona, C., Lalucat, J., Nogales, B. Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). Syst. Appl. Microbiol. 31: 231-240

1. DIVERSITAT DE LES COMUNITATS BACTERIANES MARINES A MOSTRES D'AIGUA SUPERFICIAL DE L'ÀREA DE PORT ADRIANO

1.1. Composició de les genoteques

L'estudi de diversitat de les comunitats bacterianes es basà en la realització de genoteques de 16S rDNA. S'analitzaren un total de 703 clons repartits en sis genoteques de tres estacions de mostreig diferents: al port (est. 18), a la platja (est. 13) i al punt més allunyat de la costa (est. 5) als mesos d'agost i de desembre (Taula 6). A partir de les agrupacions dels diferents clons basades en els patrons electroforètics d'RFLP, obtinguérem 312 clons pertanyents a grups que contenen dos o més clons. Per tant més de la meitat del total de clons estudiats (55,6%) eren únics representants d'un grup. Detalladament per genoteques els percentatges dels grups d'RFLP que presentaven un sol clon eren 80,3%, 78,8%, 84,9% al desembre per a port, badia i platja respectivament. I al mes d'agost amb el mateix ordre 79,7%, 87,6%,

Taula 6: Distribució del nombre de grups obtinguts per RFLP a cada una de les genoteques segons el nombre de clons.

Nombre clons per grup	Nombre de grups per genoteca					
	Badia (est.5)		Platja (est. 13)		Port (est.18)	
	agost	desembre	agost	desembre	agost	desembre
1	71	47	80	73	59	61
2	5	8	5	9	4	9
3	1	1	1	2	3	3
4	1	0	4	0	5	1
5	1	1	1	0	0	1
6	0	1	0	1	1	0
7	0	0	1	0	0	0
8	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	1	0
10	1	0	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	0
14	0	0	0	1	0	0
17	1	0	0	0	0	1
24	0	1	0	0	0	0
Total n. grups	81	60	92	86	74	76

86,9%. Així doncs, més del 70% dels grups d'RFLP a totes les genoteques eren d'un sol individu. Els grups amb dos representants eren bastant més abundants a l'hivern que a l'estiu, encara que no hi havia diferències notables entre les diferents estacions en el mateix mes. El nombre de grups amb 3 clons era més abundant al port que a la resta d'estacions. El major nombre de clons a dins un grup eren 24 a la mostra de la badia al desembre.

Un representant de cada un d'aquests grups determinats per RFLP va ser analitzat amb T-RFLP per tal de poder identificar-lo amb quatre fragments obtinguts dels extrems 5' i 3' a partir dels enzims de restricció *AluI* i *CfoI*, tal i com s'havia realitzat per l'anàlisi de comunitats, com s'ha explicat al Capítol 2 de Resultats.

1.2. Corbes d'abundància

Per a facilitar les interpretacions de les dades resultants de les comparacions dels patrons de digestions representàrem les corbes d'abundància dels diferents grups d'RFLP obtinguts en les sis genoteques, ordenades de major a menor abundància (Fig. 38). S'observà que el perfil de les corbes era semblant a totes les genoteques: presentaven un nombre reduït de grups amb abundància de clons i un gran nombre de grups amb un sol representant. Cadascuna de les corbes representades s'ajustava a una distribució log-normal amb una significació molt pròxima al 100% per a totes les genoteques, la més allunyada, la de badia al desembre presentava una significació del 98% ($p < 0,02$). Les corbes d'abundància eren menys uniformes a les genoteques corresponents a la mostra d'hivern, en les quals hi havia un grup d'RFLP dominant en front als altres.

Comparant els patrons dels grups amb dos o més clons localitzats a una estació (port, platja o badia), observàrem que al port el grup d'RFLP més abundant no era el mateix a diferents èpoques (estiu i hivern), el que indicava que succeïen canvis importants entre l'estiu i l'hivern que tenien lloc a dins el port afectant a les poblacions bacterianes que s'hi trobaven. En contraposició al port, a ambdues genoteques de la badia coincidí el grup més abundant, que també es trobava entre un dels grups de port de desembre (fletxa negra a la Fig. 38 A, B i F). Entre els grups de la platja, el més abundant localitzat al desembre coincidí amb un dels grups del mateix mes a la badia (fletxa blanca a la Fig. 38 C). En canvi, a l'agost ni a la platja ni al port trobàrem cap grup amb el mateix patró d'RFLP que a altres genoteques.

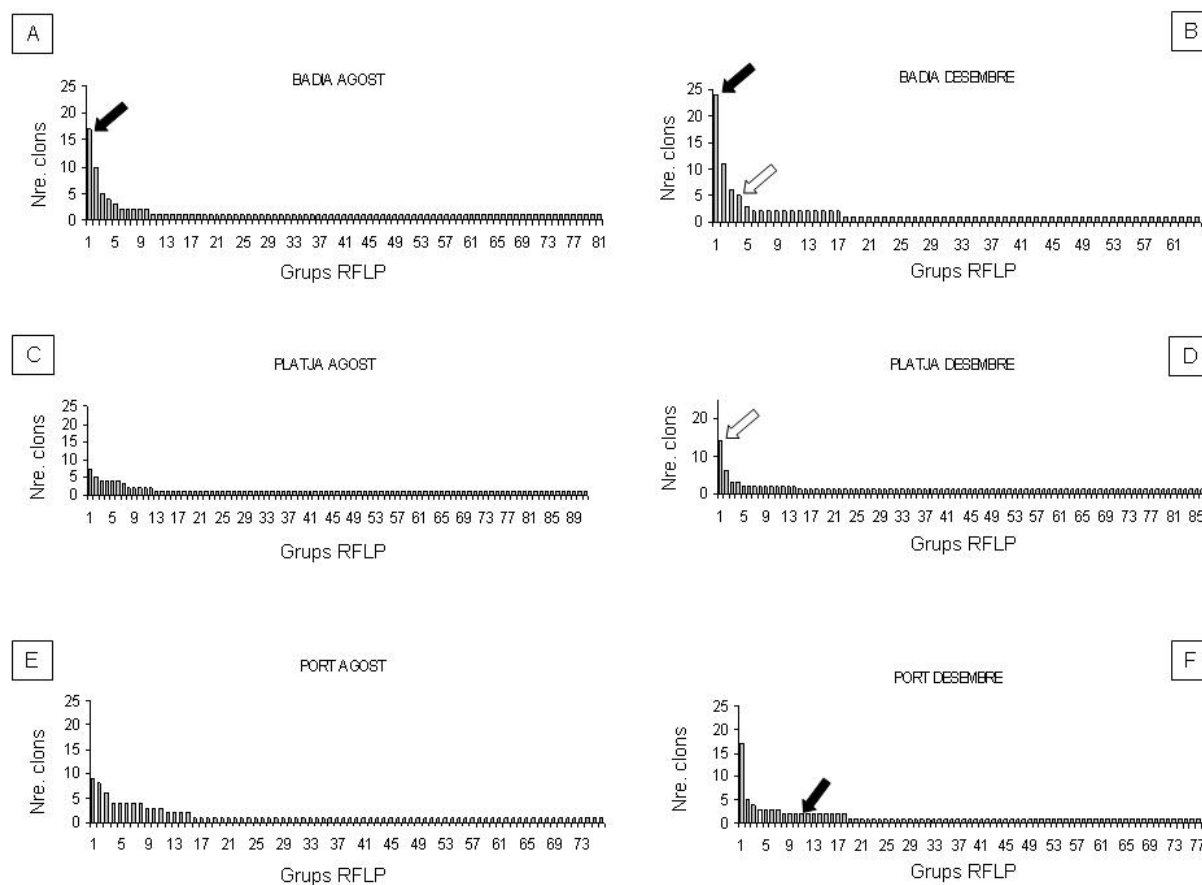


Fig.38: Corbes d'abundància on es representen els grups totals obtinguts per RFLP i el nombre de clons per a cada un d'ells. Les barres assenyalades amb fletxes d'un color (negre i blanc) representen grups amb el mateix patró de digestió. A i B: badia (agost i desembre respectivament), C i D: platja (agost i desembre), E i F: Port (agost i desembre).

1.3. Índexs de diversitat

El càlcul dels índexs de diversitat ens permeteren una fàcil i ràpida comparació i distinció de la diversitat bacteriana a les diferents genoteques.

Calculàrem diferents índexs per a cada una de les genoteques analitzades a partir de les agrupacions fetes mitjançant l'anàlisi d'RFLP (Taula 7). El primer que s'analitzà va ser el grau de representativitat de les genoteques a dins de la comunitat mitjançant la determinació de la cobertura, que indica quin percentatge de la comunitat bacteriana s'ha caracteritzat. Les genoteques en les que havíem obtingut un major nombre de grups d'un sol individu estaven menys caracteritzades, donant uns percentatges inferiors de cobertura que les genoteques on aquest nombre de grups únics era menor.

Per a l'estudi de diversitat de les genoteques es calculà l'índex de Shannon, essent els valors obtinguts per a les 6 genoteques superiors en tots els casos a 3,5. Els valors més elevats d'aquest índex es trobaven a les genoteques de la platja, mentre que els valors de la badia eren els més baixos i els que presentaven una major diferència entre l'estiu i l'hivern.

Taula 7: Índexs de diversitat calculats per a cada una de les genoteques.

Índexs	Badia		Platja		Port	
	agost	desembre	agost	desembre	agost	desembre
Cobertura (%)	40,83	58,04	33,88	37,61	50,42	46,49
Shannon (H)	4,00	3,51	4,35	4,19	4,02	3,98
Lloyd i Ghelardi (J)	0,91	0,86	0,96	0,94	0,93	0,92
Nre. total grups	81	60	92	86	74	76

Els valors de J, indicadors de la uniformitat de la comunitat, eren bastant elevats i augmentaven a la platja. Les majors diferències entre estiu i hivern es trobaven a l'estació allunyada de la costa, encara que aquestes diferències no eren gaire notables.

1.4. Corbes d'enrariment

Les corbes d'enrariment obtingudes per a cada una de les genoteques analitzades (Fig. 39) no presenten una asymptota clara, la qual cosa indica que l'esforç d'anàlisi realitzat no ha estat suficient per descriure la complexitat de les comunitats bacterianes estudiades. Les corbes d'agost i desembre tenen un comportament molt

semblant a les estacions pròximes a la costa, a la platja i al port, mentre que les corbes de la badia es diferencien considerablement entre elles, sent la de desembre la que presenta una forma més asimptòtica.

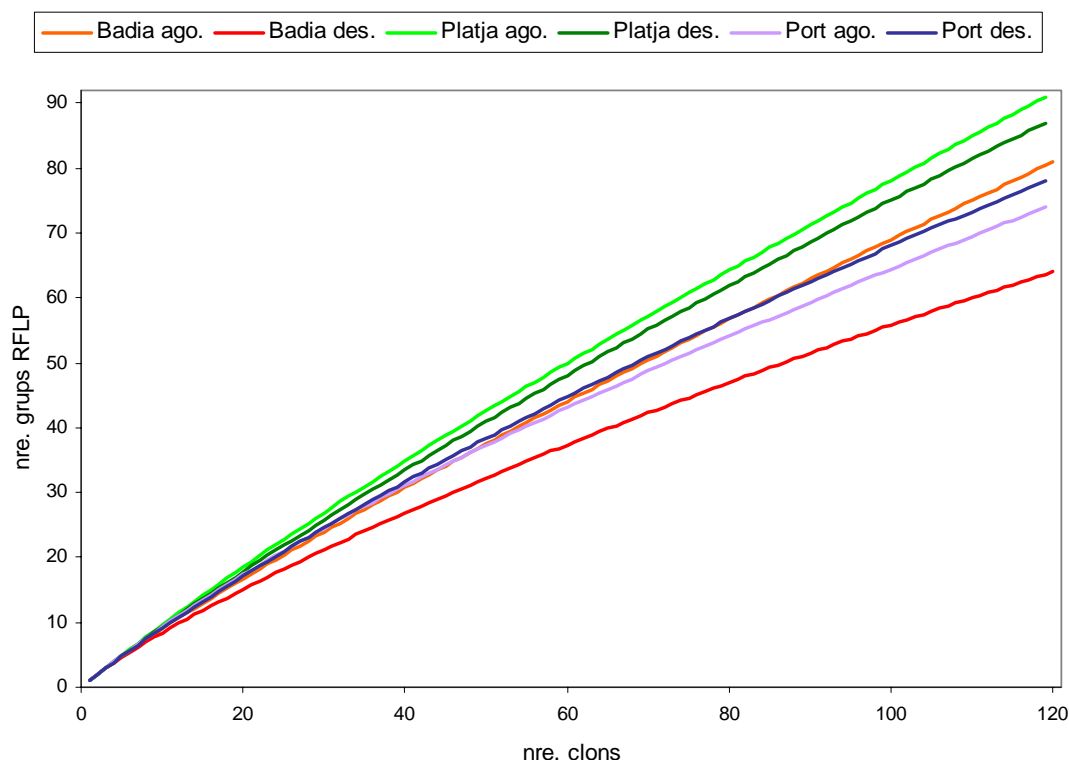


Fig.39: Corbes d'enrariment calculades per a cada una de les genoteques.

1.5. Comparació estadística de les genoteques.

L'aplicació del programa LIBSHUFF permet comparar dues genoteques per determinar si són significativament diferents (Singleton *et al.*, 2001). Les comparacions es realitzaren considerant les genoteques d'agost i desembre de cada estació de mostreig conjuntament com a mostres representatives de les comunitats de port, platja i badia, respectivament. Es compararen les seqüències de 16S rDNA en un rang aproximat de 490 nt. Els resultats de la comparació de la composició de les genoteques de port i de platja donaven valors significativament diferents ($p=0,023$); entre les mostres del port i de la badia aquesta diferència augmentava ($p=0,001$), en canvi comparant la composició de les genoteques de la platja i la badia les mostres no presentaven una diferenciació significativa ($p=0,103$).

2. IDENTIFICACIÓ DE LES POBLACIONS BACTERIANES MAJORITÀRIES A LES GENOTEQUES D'AIGUA SUPERFICIAL DE PORT ADRIANO

2.1. Principals grups filogenètics observats a les genoteques

La identificació de les poblacions bacterianes més representatives de les comunitats estudiades es realitzà mitjançant seqüenciació de gens de 16S rDNA, i es basà en els resultats obtinguts amb l'anàlisi d'RFLP. Així, seqüenciàrem un clon representant de cada un dels grups formats per dos o més clons obtinguts a partir de les comparacions dels patrons de restricció (apartat 5 de Materials i Mètodes). Es considerà per tant que tots els membres de cadascun dels grups majoritaris eren similars al seu clon representant, i s'identificà el conjunt del grup amb la seqüenciació d'aquest clon representatiu. A la Taula 8 s'indica el nombre total de clons que pertanyen a grups constituïts per 2 ó més clons (anomenats majoritaris en aquest treball) i la seva abundància en percentatges dins cada genoteca.

Taula 8: Nombre de clons que pertanyien a grups amb dos o més representants i percentatges de clons identificats dins cada genoteca.

Genoteca	Nre. clons en grups RFLP majoritaris	% clons identificats
Badia agost	49	40,83
Badia desembre	65	58,03
Platja agost	41	33,88
Platja desembre	44	37,61
Port Agost	60	50,42
Port desembre	53	46,49

L'anàlisi filogenètica realitzada va permetre afiliar les seqüències de 16S rDNA obtingudes en el conjunt de les sis genoteques als següents grups filogenètics: *Proteobacteria* [classes Alpha (α) i Gamma (γ)], *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* i a seqüències de 16S rDNA de cloroplasts d'algues eucariotes. L'afiliació a diferents grups filogenètics de les seqüències de 16S rDNA dels clons es va fer en base als resultats derivats de la comparació amb seqüències de referència dipositades en bases de dades públiques i per comparació amb la base de dades del programa ARB, utilitzant l'eina de parsimònia implementada en aquest programa (apartat 5.2 de Materials i Mètodes). Els grups més abundants eren α -, γ -

Proteobacteria i *Bacteroidetes*, grups habitualment observats en genoteques marines. Aquests eren els grups predominants segons l'abundància relativa dels T-RF que havien estat presumptivament identificats (capítol 2 de Resultats).

Discriminant aquests resultats per a cada una de les genoteques realitzades (Fig. 40) podíem analitzar la proporció de seqüències afiliades a diferents grups filogenètics en funció de l'estació de mostreig (al port, a la platja i a la badia) i de l'estacionalitat (estiu/hivern).

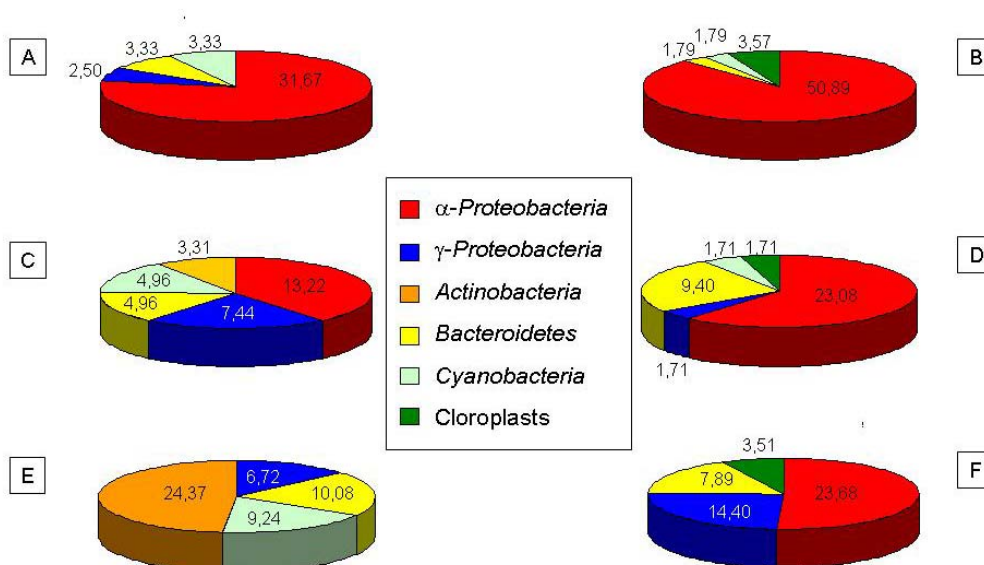


Fig. 40: Identificació per seqüenciació i percentatges d'abundància dels grups majoritaris obtinguts per RFLP per a cada una de les genoteques, A: badia agost, B: badia desembre, C: platja agost, D: platja desembre, E: port agost i F: port desembre.

2.1.1. Diferències temporals entre les genoteques d'agost i de desembre

El grup filogenètic més abundant per a totes les genoteques, llevat de la del port a l'estiu, era el de la classe *α-Proteobacteria*; el nombre de clons pertanyents a aquest grup augmentava considerablement a l'hivern a totes les estacions. La variació temporal en el nombre de clons pertanyents a la classe *γ-Proteobacteria* es produïa a totes les estacions de forma diferenciada, així a la badia i a la platja disminuïen considerablement el nombre de clons a l'hivern, mentre que al port aquests augmentaven. Es detectaren clons associats al grup *Bacteroidetes* a totes les estacions, les diferències que presentaven eren una major abundància a l'estiu a les genoteques del port i la badia i una major abundància a l'hivern a la platja. Els grups

de clons afiliats a *Cyanobacteria* detectats tenien una major presència a l'estiu que a l'hivern. Les úniques seqüències detectades tan sols a un dels dos mesos analitzats van ser les afiliades amb *Actinobacteria* i els cloroplasts d'algues, els primers els trobarem únicament a l'estiu (al port, on constituïren el grup majoritari, i a la platja), mentre que els cloroplasts tan sols a l'hivern a totes les estacions.

En general podem afirmar que la variabilitat temporal dels bacteris era molt més pronunciada pròxima a la costa (platja i port) que al punt més allunyat d'ella (badia) on no es produïen canvis tan importants.

2.1.2. Diferències espacials entre les estacions del port, platja i badia

Pel que fan les diferències espacials, es produïa una forta disminució de la presència de clons amb seqüències afiliades a la classe α -*Proteobacteria* amb la disminució de la distància al port principalment a l'estiu. En canvi, la variació espacial de clons afiliats a la classe γ -*Proteobacteria* presentava un augment a les estacions més properes al port; a l'estiu era a la platja on presentaven una major abundància, mentre que a l'hivern era al port on es detectava majoritàriament aquest grup. Al grup dels *Bacteroidetes* l'abundància era major a les estacions pròximes al port (entre un 10 i un 5%) mentre que a l'estació de la badia tan sols ens trobàvem un 3,33% a l'estiu i un 1,79% a l'hivern. L'abundància detectada de clons pertanyent a *Cyanobacteria* no presentava grans variacions entre les estacions de la badia i de la platja al mateix mes (agost i desembre), mentre que al port a l'estiu era molt més abundant que a les altres estacions i a l'hivern no es detectava. Les seqüències d'*Actinobacteria*, presents tan sols al port i a la platja, eren molt més abundants al primer amb un percentatge d'un 24,37% en front del 3,31% amb que es trobaren a la platja. Finalment els clons amb seqüències de 16S rDNA afiliades a cloroplasts d'algues eucariotes es detectaren a totes les estacions amb una abundància inferior a la platja.

2.2. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades a la classe *Alpha Proteobacteria*

Entre els clons seqüenciats que s'afiliaven amb la classe α -*Proteobacteria* identificarem tres importants subgrups característics de les genoteques de 16S rDNA de l'hàbitat marí (Fig. 41): els grups de SAR11, SAR116 (Mullins *et al.*, 1995) i un grup de seqüències relacionades amb el grup filogenètic de *Roseobacter*, tots tres repartits de forma molt diferenciada entre les zones estudiades. L'anàlisi de l'abundància dels tres grups identificats (SAR11, SAR116 i *Roseobacter*) es va fer a partir del nombre de

clons obtinguts per a cada genoteca i poder observar així l'abundància de cada grup en relació al lloc i al moment detectat.

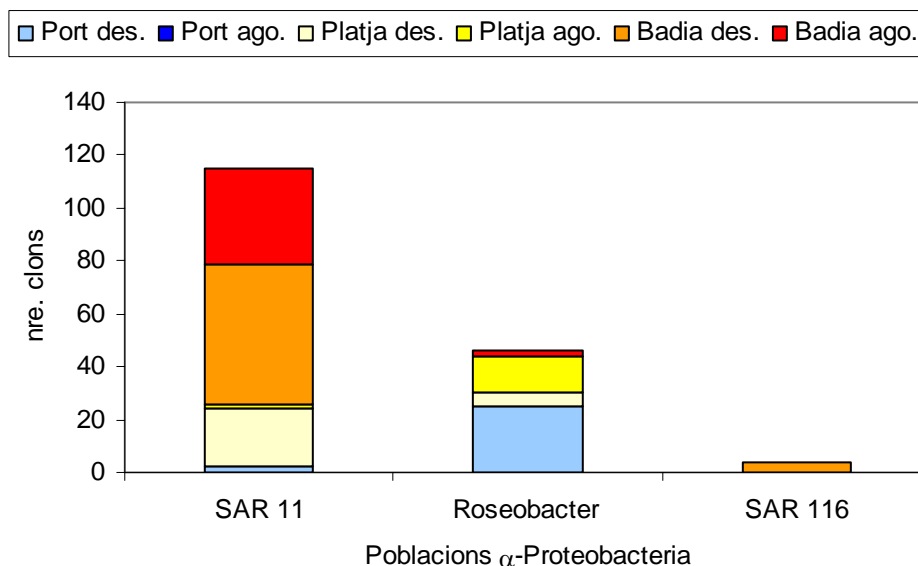


Fig.41: Abundància en nombre de clons per a cada subgrup d' α -Proteobacteria.

El nombre de clons identificats com a α -Proteobacteria eren 165, dels quals 108 corresponien a SAR11, 46 al grup de *Roseobacter* i 4 a SAR116; el repartiment entre els grups presentava grans diferències d'abundància (*Roseobacter* era 10 vegades més abundant que SAR116 i menys de la meitat que SAR11). Els clons relacionats amb SAR11 es trobaren a totes les genoteques de desembre i es detectaren abundantment a l'agost a la badia i discretament a la platja. Les dues úniques seqüències de 16S rDNA identificades com a SAR116 pertanyien a la genoteca de la badia del mes de desembre, per tant aquest grup no es detectà a les proximitats de la costa. Pel que fa a les seqüències de 16S rDNA relacionades amb *Roseobacter*, detectàrem clons d'aquest grup a la platja (tres dels seus representants BES37, BES39 i BES139 a l'estiu, dos a l'hivern BEW24 i BEW120); al port (tres a l'hivern MAW4, MAW20 i MAW54) i finalment, un a la badia l'agost, BAS35 [BA: badia, BE: platja (beach), MA: port (marina), S: estiu (summer) i W: hivern (winter)].

Cal destacar doncs, la major detecció de clons relacionats amb els grups de SAR11 i SAR116 als hàbitats més allunyats de la costa; així com la presència de clons relacionats amb el grup filogenètic de *Roseobacter* majoritàriament al port i a la platja. Aquest mateix comportament per aquestes poblacions era el que es descrivia amb l'anàlisi de comunitats mitjançant T-RFLP (Capítol 2 de Resultats).

En funció de la estacionalitat (estiu/hivern) també es detectaren diferències del nombre de clons a dins la classe *α -Proteobacteria*, identificant 111 clons al desembre i menys de la meitat (54) a l'agost.

Les relacions entre les seqüències de 16S rDNA dels clons pertanyents a la classe *α -Proteobacteria* i amb seqüències de referència de les bases de dades es presenten a la Taula 9 i a l'arbre que es mostra a la Figura 42. Les seqüències identificades com a SAR11 s'agrupaven majoritàriament en dos grups ben definits (la similitud entre les seqüències de cadascun dels grups era superior al 97%). El primer grup format per les seqüències BAS19, BAW127, BES62, BEW21, BAW10, BAW7, BEW9, MAW19, BAW53, BEW28 i BAS16; estava relacionat amb la seqüència de 16S rDNA de l'únic representant cultivat del grup, "*Candidatus Pelagibacter ubique*" (Rappé *et al.*, 2002). Al segon grup hi pertanyen BAW36, BAW1, BEW20, BAS53, BAW43, BAW18, BAS166 i BAS15. En el primer d'aquests grups ens trobarem seqüències procedents de les tres estacions, principalment en el desembre, menys tres seqüències d'agost, BAS16 i BAS19, que es trobaren a la badia i una BES62 a la platja. En canvi, en el segon totes les seqüències menys una, BEW20 que es localitzava a la platja al desembre, es detectaven a l'estació de la badia i aquestes es trobaven majoritàriament al desembre. Cap de les seqüències d'aquest segon grup relacionades amb SAR11 era localitzada al port.

El grup de clons relacionats amb el gènere *Roseobacter* era el segon més abundant pel que fa als clons amb seqüències de 16S rDNA afiliades a la classe *α -Proteobacteria*. Aquestes seqüències es detectaven al port a l'hivern (MAW 4, 9, 20, 30 i 54) i a la badia a l'estiu (BAS 35), mentre que a la platja es detectaven independentment a l'hivern (BEW 24, 120) i a l'estiu (BES 37 i 139). Les diferències més destacables eren que les seqüències detectades al port i a la platja s'associaven a organismes cultivats del gènere *Marinovum*, *Roseovarius* i *Loktanella* i a grups detectats a la costa o a sediments, com CHAB-I-5 i AS-26 (Buchan *et al.*, 2005). En canvi, les seqüències detectades a la badia es relacionaven amb clons trobats a l'oceà (Brown *et al.*, 2005)

Taula 9: Identificació i abundància dels clons afiliats amb la classe α -Proteobacteria.

Genoteca	Clon	Núm. accés	Nre. clons (%) ^a	Seqüència més relacionada ^b	Núm. accés	% Identitat	nt
Badia agost	BAS19	AM747304	10 (8,33)	clon 2C228541, SAR11	EU800439	99,80	1241
	BAS15	AM747321	5 (4,16)	clon 2C228081, SAR11	EU800099	94,00	1243
	BAS16	AM747303	17 (14,16)	clon SPOTSAUG01_5m28, SAR11	DQ009195	99,30	610
	BAS35	AM747332	2 (1,66)	clon MB-C2-128, <i>Roseobacter</i>	AY093481	96,61	1270
	BAS53	AM747314	2 (1,66)	clon 6C233110, SAR11	EU805122	97,00	1270
	BAS166	AM747315	2 (1,66)	clon SPOTSAPR01_5m186, SAR11	DQ009166	98,00	441
Badia desembre	BAW10	AM747306	24 (20)	clon SPOTSAUG01_5m28, SAR11	DQ009195	99,87	980
	BAW1	AM747316	6 (5,00)	clon 6C232251, SAR11	EU804346	100,00	773
	BAW7	AM747305	11 (9,17)	clon SPOTSAUG01_5m61, SAR11	DQ009205	99,40	702
	BAW43	AM747319	5 (4,17)	clon SPOTSAPR01_5m186, SAR11	DQ009166	99,04	438
	BAW18	AM747317	2 (1,67)	clon MB11B07, SAR11	AY033299	99,70	308
	BAW14	AM747333	2 (1,67)	clon 1C226929, SAR116	EU799343	94,70	830
	BAW53	AM747307	3 (2,50)	clon 4C230277, SAR11	EU802886	99,10	1026
	BAW36	AM747318	2 (1,67)	clon SPOTSAPR01_5m186, SAR11	DQ009166	98,37	798
	BAW46	AM747334	2 (1,67)	clon 4C230433, SAR116	EU803029	98,90	992
Platja agost	BES37	AM747329	5 (4,13)	clon T66ANG3, <i>Roseobacter</i>	AJ633984	96,39	1221
	BES139	AM747330	2 (1,65)	clon 1C227003, <i>Roseobacter</i>	EU799409	97,60	943
	BES39	AM747328	7 (5,78)	clon DS022, <i>Roseobacter</i>	DQ234106	100	342
	BES62	AM747309	2 (1,65)	clon SPOTSAUG01_5m89, SAR11	DQ009251	100	731
Platja desembre	BEW9	AM747310	6 (5,13)	clon 1C226918, SAR11	EU799420	99,70	1249
	BEW21	AM747310	14 (11,96)	clon SPOTSAUG01_5m89, SAR11	DQ009251	99,90	755
	BEW24	AM747322	3 (2,56)	<i>Loktanella marincola</i> DSW-18, <i>Roseobacter</i>	EF202613	98,95	760
	BEW20	AM747320	2 (1,71)	clon SPOTSAPR01-5m186, SAR11	DQ009166	99,53	632
	BEW120	AM747331	2 (1,71)	<i>Roseovarius crassostreae</i> CV919-312, <i>Roseobacter</i>	AF114484	97,61	752
Port desembre	MAW9	AM747324	17 (15,04)	<i>Loktanella marincola</i> DSW-18, <i>Roseobacter</i>	EF202613	99,91	1048
	MAW20	AM747325	5 (4,42)	<i>Loktanella marincola</i> DSW-18, <i>Roseobacter</i>	EF202613	99,21	759
	MAW54	AM747324	3 (2,65)	<i>Roseobacter</i> sp. 14III/A01/00	AY576690	98,18	330
	MAW19	AM747313	2 (1,77)	clon 6C233278, SAR11	EU805278	99,60	1249

^a Percentatge de l'abundància de cada grup a dins la genoteca on s'hi troba el clon representant.^b Seqüències més relacionades obtingudes amb el programa FASTA.

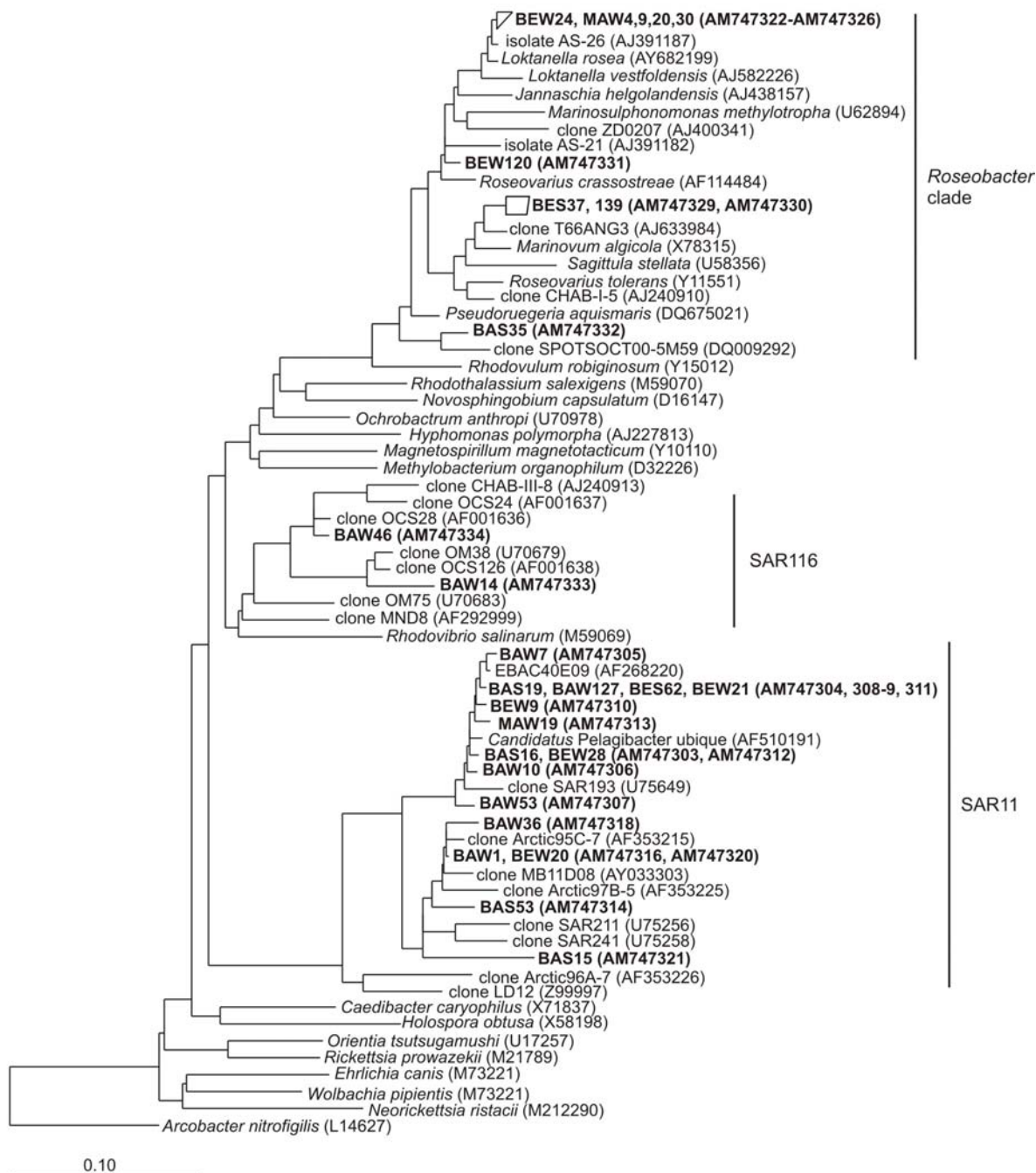


Fig. 42: Arbre de Neighbor-joining de les seqüències de 16S rDNA relacionades amb α -Proteobacteria. En negreta s'han destacat els clons obtinguts en aquest estudi indicant la genoteca on s'han detectat (BAS: badia agost, BAW: badia desembre, BES: platja agost, BES: platja desembre, MAW: port agost i MAS: port desembre).

2.3. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades a la classe *Gamma Proteobacteria*

Les seqüències de 16S rDNA dels clons identificades com a membres de la classe *γ-Proteobacteria* es relacionaren en 6 subgrups (Fig. 43): un grup de *γ-Proteobacteria* oligotròfics d'origen marí, denominat OMG (Cho i Giovannoni, 2004); el grup SAR86; un grup no cultivat detectat a aigües costaneres de Georgia, SIMO-3997 (Mou *et al.*, 2007); un altre grup no cultivat, relacionat amb el clon CHAB-III-7 obtingut al Mediterrani (Schäfer *et al.*, 2000) i finalment, el gènere *Acinetobacter*.

A diferència dels clons relacionats amb la classe *α-Proteobacteria* on predominava SAR11, l'abundància per a cadascun dels subgrups dels clons afiliats a *γ-Proteobacteria* era molt similar, és a dir, no hi havia un subgrup dominant. Encara que els clons amb seqüències de 16S rDNA relacionades amb el grup OMG fossin els més abundants, no destacaven sobre la resta (Fig. 43).

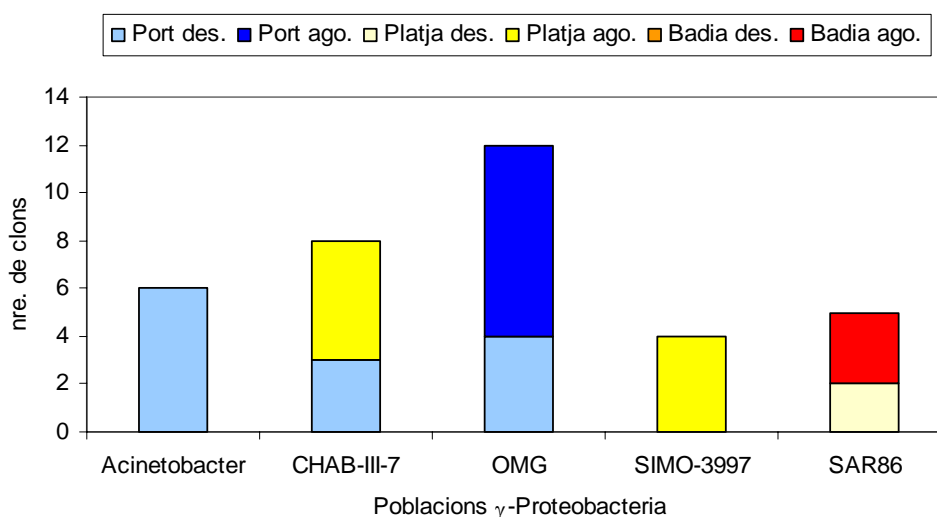


Fig.43: Abundància en nombre de clons per a cada subgrup de *γ-Proteobacteria*.

El més destacat era que la majoria dels subgrups de *γ-Proteobacteria* detectats es trobaven al port a l'hivern, llevat dels grups SAR86 que es trobà a la badia a l'estiu i a la platja a l'hivern. El grup relacionat amb SIMO-3997 únicament es trobà a la platja l'agost. Cal realçar també que l'únic grup de la classe *Gamma* present a la badia fos SAR86, tota la resta de subgrups estaven localitzats a prop de la costa. L'únic grup de *γ-Proteobacteria* associat a un membre cultivat, *Acinetobacter*, es detectà exclusivament al port al desembre, genoteca on es detectaren més abundantment les seqüències de 16S rDNA associades a *γ-Proteobacteria* en aquest estudi (Taula 10).

Taula 10: Identificació i abundància dels clons afiliats amb la classe γ -Proteobacteria.

Genoteca	Clon	Núm. accés	Nre. clons (%) ^a	Seqüència més relacionada ^b	Núm. accés	% Identitat	nt
Badia agost	BAS55	AM747347	3 (2,50)	clon a713004, SAR86	AY907789	99,31	1019
Platja agost	BES22	AM747339	3 (2,48)	clon 2C228195	AJ240921	99,90	815
	BES11	AM747345	4 (3,31)	clon CHAB-III-7	DQ295942	99,40	670
	BES21	AM747338	2 (1,65)	Clon SIMO-3997	EU800188	99,90	747
Platja desembre	BEW111	AM747346	2 (1,71)	clon EBAC10E09, SAR86	AY552545	94,95	653
Port agost	MAS4	AM747343	4 (3,36)	clon , OM60	EU802537	99,60	820
	MAS35	AM747341	4 (3,36)	clon , OM60	EU799235	97,70	810
Port desembre	MAW6	AM747340	3 (2,65)	clon CHAB-III-7	EU799222	100,00	439
	MAW62	AM747342	2 (1,78)	clon Chl1.41, OM60	DQ071054	98,92	1296
	MAW11	AM747335	2 (1,78)	<i>Acinetobacter schindleri</i>	AJ275040	96,46	1271
	MAW22	AM747336	2 (1,78)	<i>Acinetobacter schindleri</i> , EH28	EU703817	99,7	799
	MAW24	AM747337	2 (1,78)	<i>Acinetobacter schindleri</i>	AJ275040	99,71	682
	MAW74	AM747344	2 (1,78)	clon SPOTSAPR01-5m162, OM60	DQ009134	99,41	848

^a Percentatge de l'abundància de cada grup a dins la genoteca on s'hi troba el clon representant.

^b Seqüències més relacionades obtingudes amb el programa FASTA.

2.4. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades al filum *Bacteroidetes*

El nombre de seqüències de 16S rDNA afiliades a *Bacteroidetes* van ser 16, majoritàriament de les genoteques de la platja i del port. A la Taula 11 es presenten els resultats de la identificació i l'abundància a dins cada genoteca segons el nombre de clons obtinguts amb els mateixos patrons de digestions.

A la Figura 44 es representa l'arbre obtingut a partir de les seqüències de 16S rDNA relacionades amb *Bacteroidetes*. Totes les seqüències relacionades amb el filum *Bacteroidetes* detectades en aquest estudi es relacionaven amb la Classe *Flavobacteria*. Majoritàriament aquestes seqüències de 16S rDNA s'associaven a bacteris no cultivats, amb l'excepció de la seqüència del clon MAS2 detectat a l'estiu al port que s'identificava amb *Winogradskyella poriferorum* (Lau *et al.*, 2005). Les seqüències localitzades a la badia i al port pertanyien únicament a la família *Flavobacteriaceae*. En canvi, la majoria de les seqüències detectades a la platja s'identificaven amb el grup agg58 (De Long *et al.*, 1993; O'Sullivan *et al.*, 2004) i amb la família *Cryomorphaceae*.

Dins el grup de la família *Flavobacteriaceae* es trobaven les 3 úniques seqüències associades amb *Bacteroidetes* detectades a la genoteca de la badia, que estaven relacionades amb clons de la superfície oceànica (Amann *et al.*, 1990) i amb clons del Mar del Nord pertanyents al grup NS4 que està format per seqüències procedents de medis marins i d'estuaris (Alonso *et al.*, 2007). Igualment, les seqüències del port MAW5, MAS70 i MAS75 es relacionaven amb seqüències d'aquests ambients i amb el grup DE2 detectat a l'estuari de Delaware (Kirchman *et al.*, 2003). Pertanyents a la família *Flavobacteriaceae* es trobaven el clon BES26, localitzat a la genoteca de la platja a l'estiu, juntament amb els clons MAW17 i MAW77, detectats al port a l'hivern. Tots ells formaven un nou grup que s'associava remotament amb representants cultivats i altres seqüències ambientals dins d'aquesta família. Per una altra banda, aquests clons es relacionaven amb seqüències parcials extreïdes d'un microcosmos provinent del nord-oest del Mar Mediterrani (Pinhassi *et al.*, 2004) i amb seqüències procedents d'un llac hipersalí estudiat al projecte Global Ocean Survey (Rusch *et al.*, 2007). Per una altra banda es trobaren dos clons a la genoteca de la platja relacionats amb la família *Cryomorphaceae*, com BEW113 associat amb el clon NorSea84 (Alonso *et al.*, 2007), mentre que l'altra, BEW12, formava un grup juntament amb seqüències pertanyent a un clon detectat en l'enriquiment d'aigües de l'oceà Àrtic amb dimetilsulfit (AF468245).

Taula 11: Identificació i abundància de cada un dels grups d'RFLP afiliats a *Bacteroidetes*.

Genoteca	Grup RFLP	Núm. accés	Nre. clons (%) ^a	seqüència més relacionada ^b	núm. accés	% identitat	nt
Badia agost	BAS11	AM747361	2 (1,67)	clon NorSea72, <i>Flavobacteriaceae</i>	AM279212	97,27	769
	BAS119	AM747362	2 (1,67)	clon NorSea72, <i>Flavobacteriaceae</i>	AM279212	95,2	411
Badia desembre	BAW9	AM747363	2 (1,78)	clon SPOTSAPR01-5m139, <i>Flavobacteriaceae</i>	DQ009085	98,72	1323
Platja agost	BES4	AM747355	4 (3,31)	clon BL03-SUM02, agg58	DQ778200	100	623
	BES26	AM747352	2 (1,65)	<i>Cytophaga</i> sp. T-588, <i>Flavobacteriaceae</i>	AB073567	98,64	696
Platja desembre	BEW12	AM747357	3 (2,56)	clon N60e-126, <i>Cryomorphaceae</i>	EF645953	87,94	1285
	BEW54	AM747358	2 (1,71)	clon BL03-SUM02, agg58	DQ778200	94,41	662
	BEW113	AM747360	2 (1,71)	clon NorSea84, <i>Cryomorphaceae</i>	AM279181	100	705
	BEW82	AM747359	2 (1,71)	clon F4C41, <i>Flavobacteriaceae</i>	AY794206	97,72	658
	BEW130	AM747356	2 (1,71)	Clon SPOTSAPR01-5m210, agg58	DQ009083	99,69	645
Port agost	MAS2	AM747351	6 (4,96)	<i>Winogradskyella poriferorum</i> , <i>Flavobacteriaceae</i>	AY848823	95,13	1318
	MAS75	AM747349	4 (3,31)	clon 1C227016, <i>Flavobacteriaceae</i>	EU799420	99,60	710
	MAS70	AM747348	2 (1,65)	clon 1C227016, <i>Flavobacteriaceae</i>	EU799420	99,90	818
Port desembre	MAW5	AM747350	4 (3,54)	clon 1C227016, <i>Flavobacteriaceae</i>	EU799420	99,80	1322
	MAW17	AM747353	3 (2,65)	<i>Cytophaga</i> sp. T-588, <i>Flavobacteriaceae</i>	AB073567	90,64	1287
	MAW77	AM747354	2 (1,77)	<i>Formosa agariphila</i> , <i>Flavobacteriaceae</i>	AJ893518	90,71	1173

^a Percentatge de l'abundància de cada grup d'RFLP a dins la genoteca on s'hi troba el clon representant.^b Seqüències més relacionades obtingudes amb el FASTA.

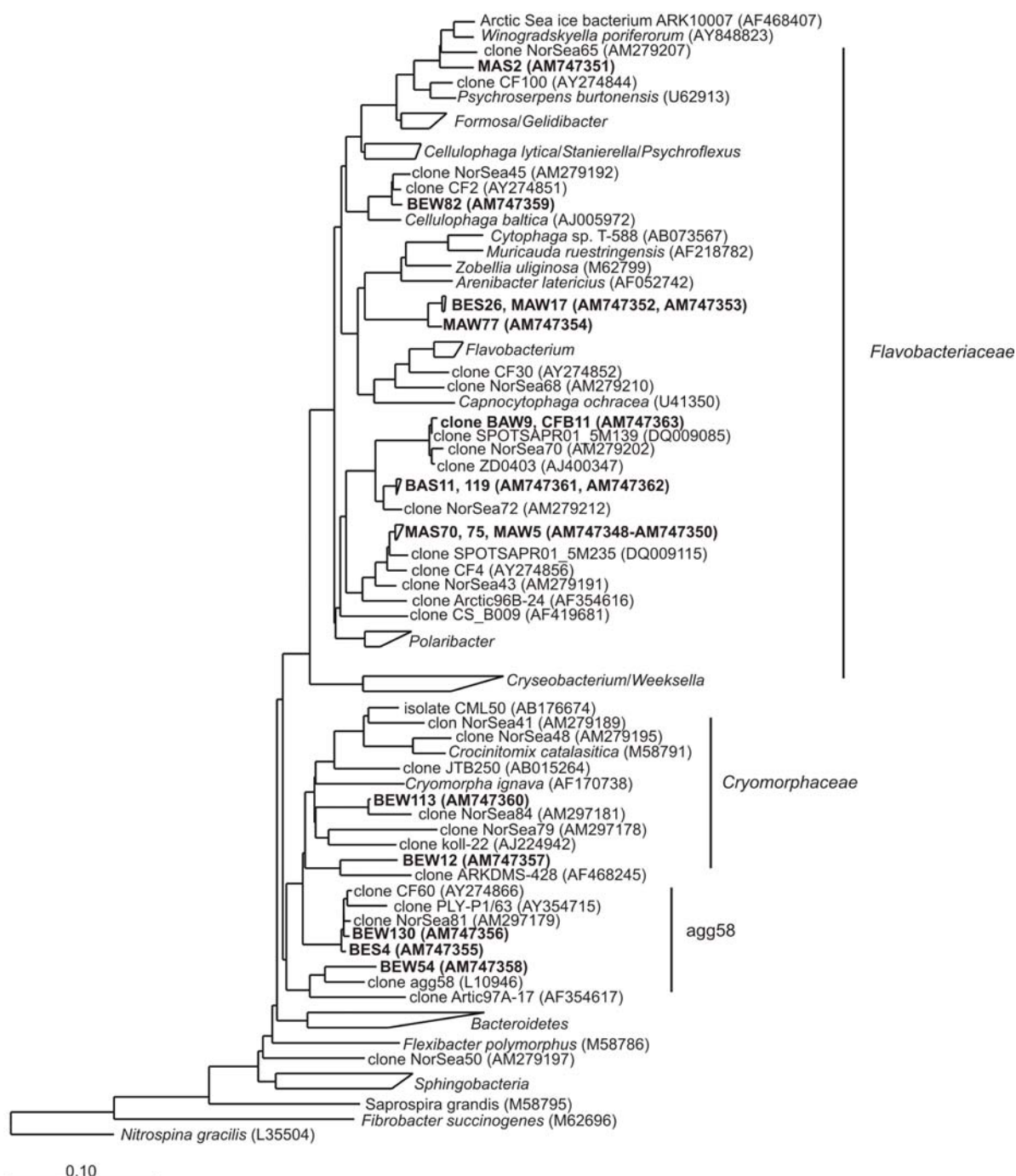


Fig.44: Arbre de Neighbor-joining de les seqüències de 16S rDNA relacionades amb *Bacteroidetes*. En negreta s'han destacat els clons obtinguts en aquest estudi indicant la genoteca on s'han detectat (BAS: badia agost, BAW: badia desembre, BES: platja agost, BES: platja desembre, MAW: port agost i MAS: port desembre).

Finalment les seqüències detectades a la platja associades al grup agg58 s'associaven a organismes no cultivats detectats al Mar del Nord (O'Sullivan *et al.*, 2004).

2.5. Diversitat de seqüències de 16S rDNA afiliades als fila *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* i als cloroplasts d'algues eucariotes

Del grup de vuit seqüències de 16S rDNA identificades com a *Actinobacteria*, sis tenien un percentatge de similitud igual o superior al 97% (MAS72, MAS118, MAS74, BES12, MAS37 i MAS45), totes menys una, BES12, pertanyien a la genoteca d'estiu del port. Les dues seqüències restants dins aquest grup localitzades al port l'agost presentaven un percentatge de similitud menor al 97% entre les demés i de menys del 94% entre elles. Cap dels clons pertanyents a *Actinobacteria* trobats a les genoteques es relacionaven amb grups detectats a l'hàbitat marí, algunes seqüències com a MAS72, BES12 estaven relacionades a un clon trobat a un estany d'aigua dolça (Hahn *et al.*, 2004), i els altres MAS45, MAS74, MAS10 es relacionaven amb clons detectats a un llac a Noruega (Warnecke *et al.*, 2004) (Taula 12).

Un altre dels grups presents a les genoteques era el de *Cyanobacteria*, tots els membres del qual estaven relacionats amb *Synechococcus*. L'abundància de seqüències de 16S rDNA afiliades a aquest grup a les genoteques era molt variable, no superava en cap d'elles el 10% i en les tres estacions estudiades sempre era major el nombre identificat a l'estiu que a l'hivern. Al punt on la seva presència es feia més patent era al port al mes d'agost, mentre que en aquest mateix punt a l'hivern ni tan sols es detectava. De les cinc seqüències de 16S rDNA relacionades amb *Cyanobacteria* cap presentava una similitud entre elles inferior al 99%, encara que eren detectades a diferents genoteques, al desembre a l'estació de la badia i a l'agost a les estacions pròximes a la costa (Taula 12).

Les seqüències identificades com a cloroplasts es trobaven tan sols a l'hivern amb un percentatge similar al port i a mar oberta, mentre que a la platja disminuïa la seva abundància. Analitzant la similitud entre les seqüències de 16S rDNA afiliades a cloroplasts d'algues eucariotes, observàrem que les localitzades al port, MAW8 i MAW57, eren idèntiques, i presentaven una similitud del 97,7% amb la detectada a la platja BEW102. Les seqüències més relacionades corresponien a 16S rDNA de cloroplasts de *Prasinophyceae*, cloròfits (AY702163 *Micromonas* i X90641 *Mantoniella squamata*). Les dues seqüències de 16S rDNA de cloroplasts pertanyents a la mostra de la badia, BAW8 i BAW81, presentaven una similitud entre elles de només el 86%,

Taula 12: Identificació i abundància dels clons afiliats a *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* i cloroplasts d'algues eucariotes.

Genoteca	Clon	Núm. accés	Nre. clons (%) ^a	Grup filo.	Seqüència més relacionada ^b	Núm. accés	% Identitat	nt
Badia agost	BAS64	AM747364	4 (3,33)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> , Minos 12 16	AY172808	98,50	663
Badia desembre	BAW8	AM747383	2 (1,79)	Cloroplast <i>Haptophyceae</i>	clon OM81	U70717	93,49	1245
	BAW81	AM747384	2 (1,79)	Cloroplast <i>Haptophyceae</i>	clon FS142-30B-02	DQ513030	92,44	992
	BAW111	AM747365	2 (1,79)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> sp. CC9605	CP000110	99,70	319
Platja agost	BES12	AM747371	4 (3,31)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	GOS_GS-33-01-01-1P3-1P8KB	ER080865	98,75	720
	BES25	AM747367	4 (3,31)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> sp., Minos 12 16	AY172808	99,10	1268
	BES20	AM747366	2 (1,65)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> sp., Minos 12 16	AY172808	100,00	733
Platja desembre	BEW7	AM747368	2 (1,71)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> WH8018	AF311291	99,40	671
	BEW102	AM747380	2 (1,71)	Cloroplast <i>Prasinophyceae</i>	<i>Micromonas</i> sp., RCC434	AY702163	100,00	743
Port agost	MAS3	AM747369	2 (1,68)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> WH7803	AY172803	99,80	613
	MAS8	AM747370	9 (7,56)	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Synechococcus</i> WH7803	AY172803	99,92	1197
	MAS39	AM747373	3 (2,52)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	clon SV1-1	AJ575515	99,92	1304
	MAS37	AM747372	8 (2,52)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	clon SV1-1	AJ575515	98,1	
	MAS85	AM747379	2 (1,68)	<i>Actinobacteria</i> , acII-B	MWH-Dar1	AJ565415	96,60	1308
	MAS118	AM747377	3 (2,52)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	clon 3C002565	EU801305	100,00	679
	MAS45	AM747374	4 (3,36)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	clon At12OctB10	AY862797	98,40	1039
	MAS74	AM747376	3 (2,52)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	clon 1061006020470	EK968235	98,50	665
	MAS10	AM747378	4 (3,36)	<i>Actinobacteria</i> , acIII	clon 1C226763	EU799192	98,80	981
	MAS72	AM747375	2 (1,68)	<i>Actinobacteria</i> , acII-A	clon At12OctB10	AY862797	99,40	786
	MAW1	AM747381	2 (1,77)	Cloroplast <i>Prasinophyceae</i>	<i>Mantoniella squamata</i> CCAP 1965/1	X90641	95,70	787
	MAW57	AM747381	2 (1,77)	Cloroplast <i>Prasinophyceae</i>	<i>Mantoniella squamata</i> CCAP 1965/1	X90641	92,76	1284

^a Percentatge de l'abundància de cada grup d'RFLP a dins la genoteca on s'hi troba el clon representant.^b Seqüències més relacionades obtingudes amb el programa FASTA.

sent la similitud amb les seqüències observades dins del port del 80%. Les dues seqüències de la badia es relacionaven amb cloroplasts d'*Haptophyceae* (*Ochrosphaera neapolitana* i *Emiliana huxleyi*).

Capítol 4:

Estructura de les comunitats bacterianes a altres sistemes

Amb la finalitat de determinar si la diversitat bacteriana observada a Port Adriano era comparable a la diversitat a altres ambients portuaris de l'illa de Mallorca, es van analitzar les comunitats bacterianes al Port de Palma (abril i juny del 2003) i a 18 ports esportius localitzats a tot el perímetre de l'illa (gener 2002).

Pel mateix motiu es realitzà també un estudi setmanal a la Platja de Palma des de març fins a desembre de 2003, aquest sistema es comparà amb els resultats obtinguts de l'estació 13 de l'estudi de Port Adriano corresponent a la platja de la zona.

1. ESTUDI DE LES COMUNITATS BACTERIANES DEL PORT DE PALMA

L'estudi del Port de Palma es realitzà mitjançant l'anàlisi de T-RFLP a 6 estacions repartides a dins i fora de la zona portuària (Fig. 7) per tal de comparar la composició i estructura de les comunitats bacterianes a mesura que augmentava la distància al port, de manera semblant al que s'havia fet a l'estudi de Port Adriano. El Port de Palma es va incloure també a l'estudi de diferents ports de l'illa realitzat al gener de 2002, però en aquella ocasió el mostreig es va realitzar a una estació propera a terra i de baixa profunditat (comparables a l'estació 18 de l'estudi de Port Adriano).

1.1 Caracterització de l'àrea de mostreig del Port de Palma amb paràmetres ambientals

A l'estudi de Port de Palma es determinaren diferents paràmetres fisicoquímics per a cada estació als dos mesos en que es realitzà el mostreig, abril i juny, com s'havia fet a Port Adriano. La temperatura de les estacions al mes d'abril oscil·laven entre 16,2°C a dins el port i 15,4°C a l'estació 6, la més endinsada a la badia. En canvi, les temperatures al juny varen ser molt constants 27°C a totes les estacions (Taula 13).

La salinitat i la conductivitat presentaven valors molt semblants als mesos mostrejats (Taula 13). Generalment a l'abril la salinitat era menor que al juny a causa de l'evaporació de l'aigua per la pujada de les temperatures a l'estiu.

Les concentracions relatives dels compostos hidrofòbics (Taula 13) es calcularen a partir de la mitjana de les estacions localitzades a dins el port (1 i 2). Els valors obtinguts no presentaven grans diferències entre les estacions, únicament cal destacar la disminució als dos mesos estudiats a l'estació 3.

Taula 13: Paràmetres fisicoquímics de l'aigua a cada una de les estacions als mesos de mostreig i la concentració relativa de compostos hidrofòbics.

Estacions	Abril				Juny			
	T ^a (°C)	Salinitat (psu)	Conductivitat (mS/cm)	Comp. Hidrofòbics	T ^a (°C)	Salinitat (psu)	Conductivitat (mS/cm)	Comp. Hidrofòbics
1	16,2	38,1	51,8	0,98	27,0	37,8	50,8	1,04
2	16,2	38,3	52,1	1,04	27,0	38,5	51,8	0,95
3	15,9	38,6	52,3	0,79	27,0	38,6	51,7	0,87
4	15,7	38,4	52,3	0,88	27,5	38,7	51,7	0,96
5	15,6	38,2	51,8	0,98	27,0	38,7	51,9	0,91
6	15,4	38,3	52,1	1,06	27,0	38,5	51,8	0,89

Les concentracions de clorofil·la *a* (Fig. 45) a l'aigua varen ser més altes al mostreig del mes d'abril, especialment a les estacions més properes al port. Els valors màxims es van observar a l'estació 2 ($4,78 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) i en general s'observà una tendència a la disminució de la concentració de clorofil·la en augmentar la distància al port. Els valors de concentracions de clorofil·la a les mostres del Port de Palma eren comparables als observats a l'estudi de Port Adriano, excepte els de l'estació 2 a l'abril que eren superiors als valors màxims de Port Adriano.

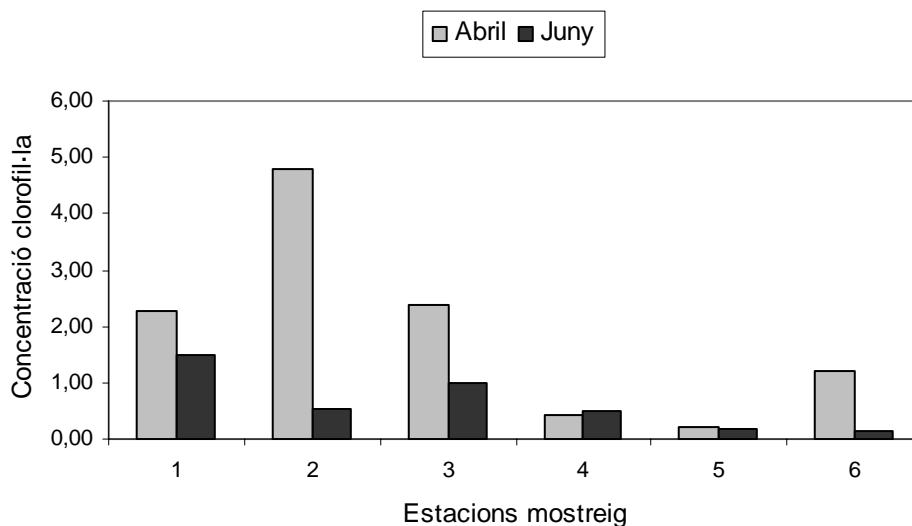


Fig.45: Concentració de clorofil·la *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) per a cada estació analitzada del Port de Palma a l'abril i al juny.

1.2 Diversitat global de les comunitats bacterianes analitzades

A les 11 mostres del Port de Palma analitzades (es va excloure l'estació 6 del mes de juny perquè no es va poder analitzar) mitjançant T-RFLP es detectaren 195 T-RF dels quals 47 eren T-RF pertanyents a l'extrem 5' dels 16S rDNA digerits amb l'enzim *AluI*, 32 eren de l'extrem 3' del mateix enzim i per a l'enzim *CfoI* 65 eren de l'extrem 5' i 51 de l'extrem 3'. Els T-RF que presentaven una abundància superior a l'1% eren 80, és a dir, més de la meitat dels fragments presentaven una abundància relativa menor a l'1%.

A l'igual que als altres sistemes estudiats, al Port de Palma es va fer l'estudi de diversitat observant els T-RF obtinguts de l'extrem 5' dels 16S rDNA digerits amb l'enzim *AluI*. El nombre d'aquests fragments variava segons l'estació i el mes de mostreig. A diferència de Port Adriano, al Port de Palma el mes d'abril no presentava el major nombre de fragments ni una major diversitat en front al mes de juny, excepte a les estacions més internes del port (est. 1 i 2). A la resta de estacions era al mes de juny quan es trobava major nombre de T-RF (Taula 14). Tant l'índex de Shannon (H') com l'índex de Lloyd i Ghelardi (J) obtinguts presentaven valors inferiors als de l'estudi de Port Adriano.

Taula 14: Índexs de diversitat de les mostres analitzades al Port de Palma a l'abril i juny 2003.

Estacions	Abril			Juny		
	Nre. T-RF	Shannon (H')	J	Nre. T-RF	Shannon (H')	J
1	25	2,55	0,80	11	1,76	0,74
2	24	2,17	0,72	27	2,30	0,80
3	13	1,92	0,77	27	2,18	0,77
4	23	2,01	0,68	30	2,37	0,79
5	21	2,12	0,82	25	2,00	0,70
6	20	2,80	0,92	-	-	-

1.3 Composició de les comunitats bacterianes marines estudiades mitjançant l'anàlisi de perfils T-RFLP de 16S rDNA a les estacions definides del Port de Palma

A l'igual que amb els resultats de T-RFLP obtinguts a Port Adriano, es normalitzaren les dades de fluorescència dels diferents perfils obtinguts i es procedí al seu alineament tal i com s'indica a l'apartat 4.5 de Material i Mètodes.

Posteriorment s'utilitzà el coeficient de Bray-Curtis per a l'obtenció de la matriu de similitud entre els perfils de T-RFLP amb el programa PAST. A la Figura 46 es

mostra l'ordenació dels perfils en un espai bidimensional, segons la matriu de similitud calculada, utilitzant el mètode d'escalat multidimensional no mètric (NMDS).

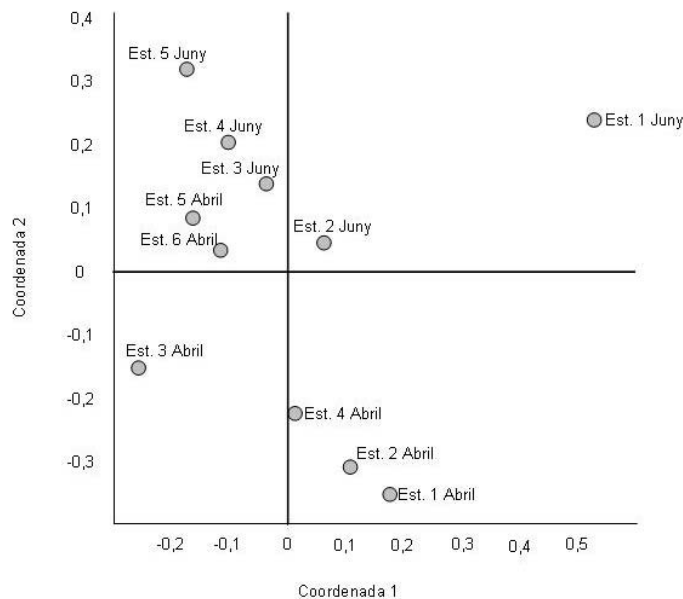


Fig. 46: Representació NMDS de les mostres de Port de Palma considerant tots els T-RF. Valor d'estrès: 0,096.

Els perfils de T-RFLP s'agrupaven principalment segons el mes en que van ser recollides les mostres, abril i juny, encara que amb algunes excepcions. Les mostres de juny es trobaven relativament agrupades, menys la de l'estació 1, el perfil de la qual no s'assemblava gaire als perfils de cap de les altres mostres (similitud inferior al 30%, calculada amb transformació logarítmica de les dades d'abundància relativa de T-RF). A més, prop dels perfils observats a les estacions de juny es trobaven també els de dues estacions (est. 5 i 6) d'abril, que eren les que estaven més allunyades del port (similituds superiors al 60%). Els perfils corresponents a les estacions 1, 2 i 4 del mostreig d'abril formaven també un grup coherent, mentre que el perfil obtingut per a l'estació 3 no es relacionava ni amb el grup de l'abril ni amb el grup format per les mostres de juny.

1.4. Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de mostres de Port de Palma

L'abundància relativa dels T-RF més representatius obtinguts en els perfils de les mostres del Port de Palma es presenta a la Figura 47 com a exemple il·lustratiu de la variació en la composició de les comunitats observades en aquestes mostres.

Per tal d'identificar les poblacions bacterianes que originaven els T-RF observats en els perfils del Port de Palma es van comparar la seva mida amb la col·lecció de fragments corresponents als clons obtinguts en l'estudi de Port Adriano. Òbviament, aquesta inferència estava limitada per l'aparició o no de fragments comuns entre els perfils de les mostres d'ambdós estudis. Així per exemple, comparant els T-RF que s'observaren a les mostres de Port de Palma amb els obtinguts a l'estudi de Port Adriano als mesos d'abril i juny del 2002 es va veure que compartien un total de 124 T-RF (36 TRF A5, 29 A3, 39 C5 i 20 C3). El nombre de T-RF que diferenciaven les mostres de tots dos ambients era però molt superior ja que hi havia 114 T-RF exclusius de Port Adriano (42 T-RF A5, 22 A3, 40 C5 i 10 C3) i 71 exclusius del Port de Palma (11 T-RF A5, 3 A3, 26 C5 i 31 C5). Malgrat aquestes diferències es va observar que els T-RF predominants a les mostres del Port de Palma també eren predominants a les mostres de l'estudi de Port Adriano (Fig. 31 i 47) i es van poder identificar algunes de les poblacions bacterianes que podien originar aquests T-RF. Es considerà que al menys 3 d'aquests 4 T-RF dels clons havien de detectar-se en el perfil de mostres ambientals i tenir una abundància relativa similar per a determinar que la població identificada pel clon es trobava als perfils de T-RFLP d'alguna de les estacions de mostreig, a l'igual que a tots els estudis realitzats.

El T-RF amb major presència entre les mostres analitzades era el fragment A5-213,3, identificat juntament amb els altres fragments de l'extrem 3' i de l'enzim *CfoI* a partir de les genoteques realitzades a Port Adriano com una població del grup *Roseobacter* pertanyent a la classe α -*Proteobacteria*. Aquesta població es detectava principalment al mes d'abril, en el que s'observava una tendència a la disminució de la seva abundància a mesura que les estacions s'allunyaven del port (Fig. 48). Al juny la seva presència era menor i tan sols es detectava amb una abundància superior al 2% a les estacions 1 i 2 més properes al port.

Una altra població identificada a totes les mostres del Port de Palma, era la representada pel T-RF A5-211,1 pertanyent també al grup *Roseobacter* (Fig.48). Els valors d'abundància detectats d'aquest T-RF eren variables entre les diferents mostres (d'1% a quasi 7%). L'abundància d'aquest T-RF a les diferents estacions del mes d'abril era molt homogènia. Al juny l'abundància d'aquesta població augmentava a totes les estacions menys a l'estació 5. Així doncs, presentava un comportament temporal igual que a Port Adriano, la seva abundància augmentava en època estival.

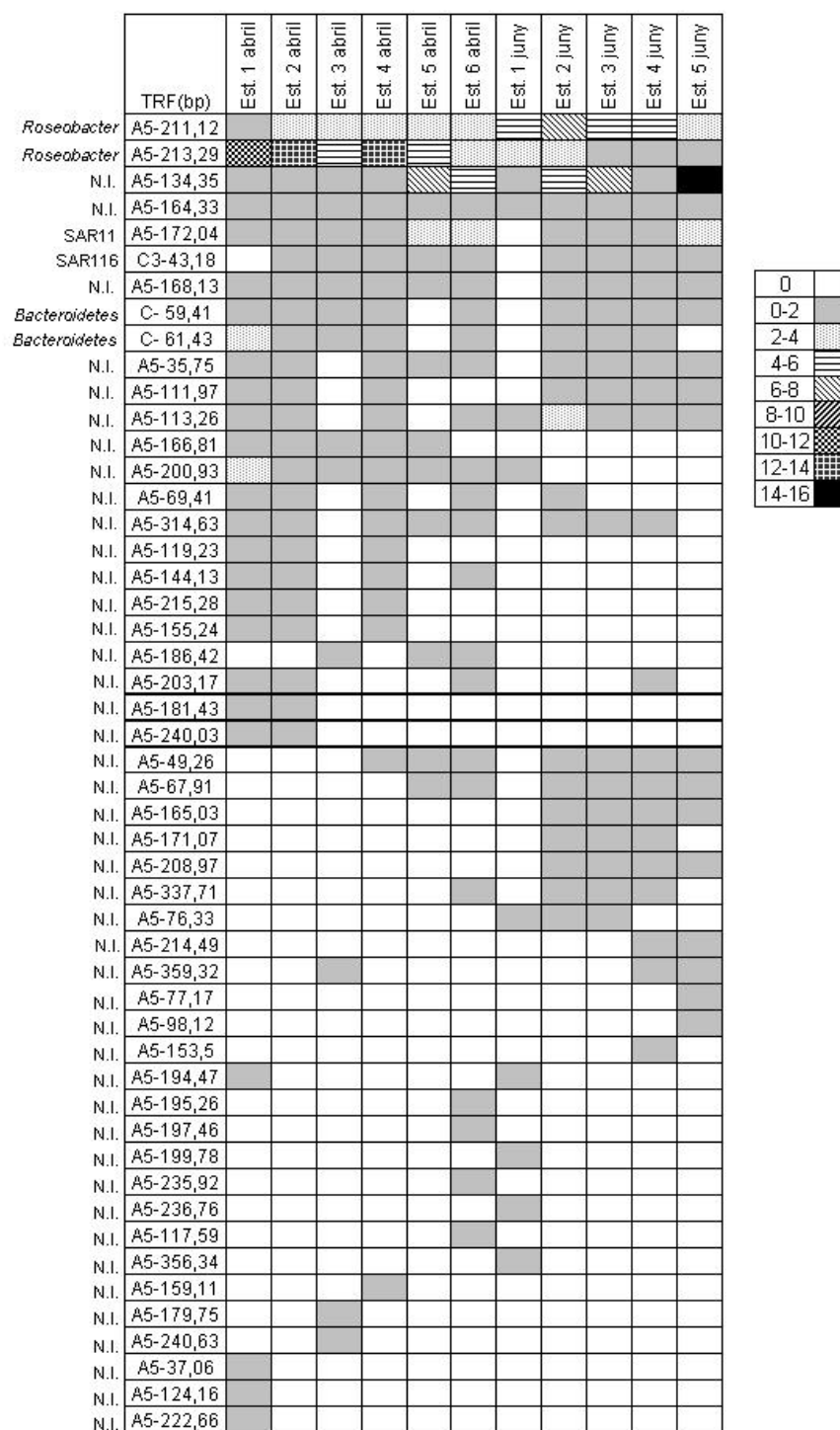


Fig. 47: Representació de l'abundància relativa de T-RF del gen 16S rRNA obtinguts en els perfils de les mostres del Port de Palma. N.I.: No identificat.

A part de les dues poblacions de *Roseobacter*, als perfils del Port de Palma únicament es va identificar una població de SAR116 (T-RF C3-43,2), que no s'observà als perfils de l'estació 1, i una població de SAR11 (T-RF A5-172,0), que només s'observà a l'estació 1 al més d'abril però no al mes de juny. L'abundància d'aquesta població de SAR11 augmentava a les mostres més allunyades del port (Fig. 47). També s'identificaren dues poblacions de *Bacteroidetes* detectades a port Adriano T-RF C5-59,4 i C5-61,4, que no es detectaren a les estacions 5 al mes d'abril ni 1 al mes de juny.

Aquestes quatre poblacions associades a α -*Proteobacteria* s'havien observat a l'estudi realitzat a Port Adriano, principalment a les mostres de badia i totes elles disminueixen en abundància o desapareixien a mesura que disminuïa la distància al port.

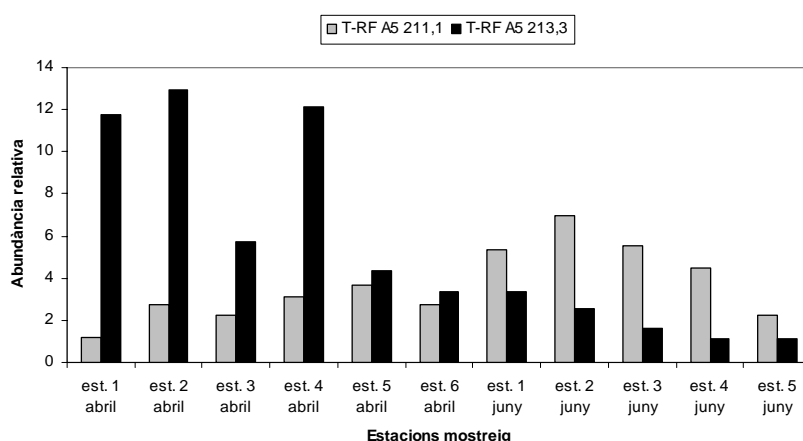


Fig.48: Comparació de les abundàncies relatives dels T-RF A5 211,1 i A5 213,3, identificats presumptivament com a dues poblacions pertanyents al grup *Roseobacter* detectades a les mostres del Port de Palma.

2. ESTUDI DE LES COMUNITATS BACTERIANES A ALTRES PORTS DE L'ILLA DE MALLORCA

2.1 Caracterització per paràmetres de diferents ports esportius ubicats al voltant de l'illa de Mallorca

L'estudi de diferents ports de l'illa de Mallorca es realitzà en un sol dia de mostreig al mes de gener de l'any 2002 (apartat 1.1.3, Materials i Mètodes). Es determinaren diferents paràmetres físics i químics com la temperatura, salinitat, conductivitat i concentració de compostos hidrofòbics, a més de la concentració de la clorofil·la *a*.

Els ports escollits estaven repartits per tota l'illa de Mallorca, el que els caracteritza per presentar unes condicions geomorfològiques i oceanogràfiques molt diferents entre ells. Aquesta marcada heterogeneïtat es manifestà amb els paràmetres determinats, tant la temperatura com la salinitat.

La temperatura variava entre 10°C i 17°C (Fig. 49), encara que el valor que presentaven la majoria dels ports era de 16°C. El mínim valor (10°C) es detectà a l'únic port de la serra de Tramuntana estudiat, Sóller, mentre que el valor màxim es trobava a dins la Badia de Palma, al club nàutic de s'Arenal i del Portixol.

Pel que fa els valors de salinitat (Fig. 49) eren molt més semblants entre els diferents ports (a l'igual que els valors de conductivitat). La majoria de valors estaven entre 36,5 i 37,3 psu, llevat d'alguns determinats ports on aquests valors disminuïen molt. El valor de salinitat més baix es donà a Sóller, 16,6 psu produït molt probablement, per l'entrada d'aigua dolça a la badia provinent de la desembocadura de dos torrents. La resta de ports on la salinitat era baixa es trobava entre valors de 28,6 i 31,6 psu, tots ells s'ubicaven a la Badia de Palma i propers a la ciutat: s'Arenal, Palma 1 i 2 (es van recollir dues mostres al port de Palma) i es Portixol, per ordre creixent de salinitat.

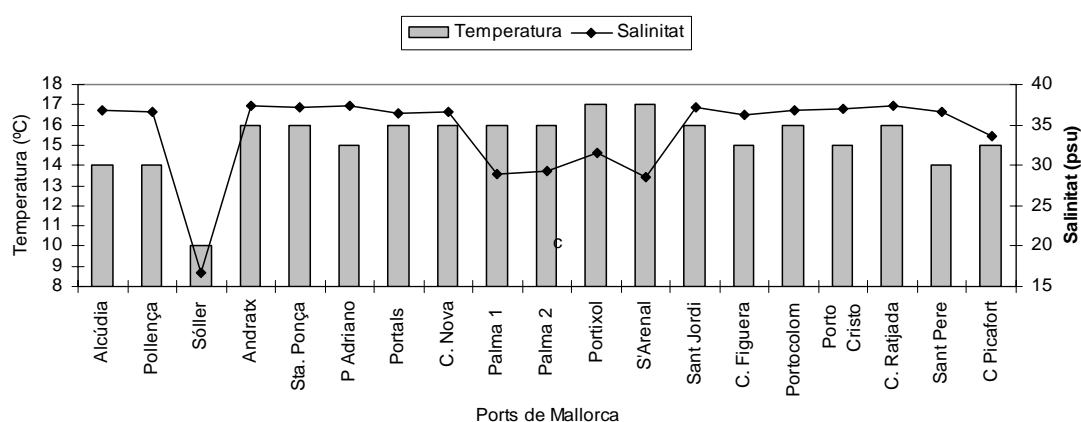


Fig. 49: Representació de la temperatura (°C) i salinitat (psu) dels 19 ports analitzats de l'illa de Mallorca.

Pel que fa a les concentracions de clorofil·la a (Fig. 50) hi havia variacions en els diferents ports però els valors mitjans estaven entre 2,5 i 3 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ excepte als ports de Portocolom i Porto Cristo, on les concentracions de clorofil·la eren molt elevades (aprox. 19 i 24 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivament).

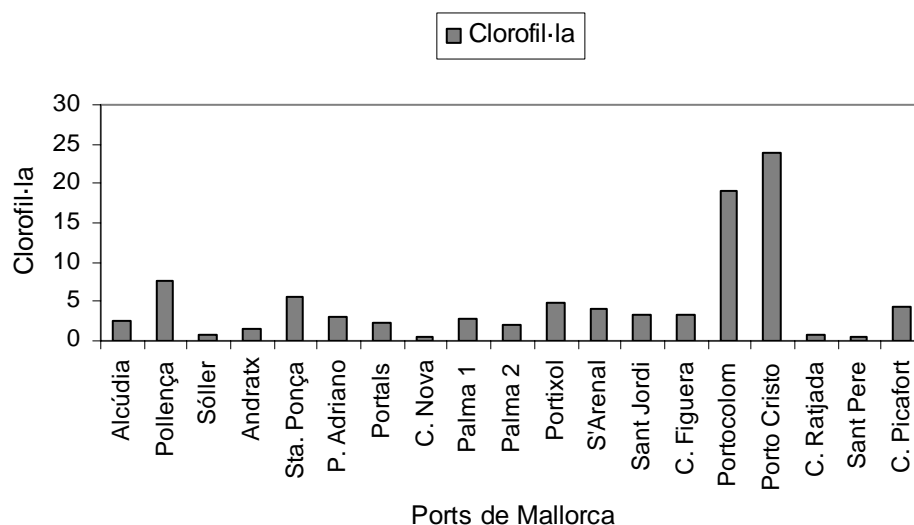


Fig. 50: Concentració de clorofil·la a ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) als diferents ports analitzats.

2.2 Diversitat global de les comunitats microbianes analitzades a diferents ports de l'illa de Mallorca

L'índex de Shannon (H') per a tots els ports estudiats era elevat, al voltant de 3. Els índexs de Lloyd i Gheraldi (J), indicatius de la uniformitat de les comunitats, a més de ser elevats, presentaven uns valors molt homogenis entre els diferents ports esportius (Taula 15).

Taula 15: Nombre de T-RF totals, valors d'índex de Shannon (H') i valors d'índex de Lloyd i Gheraldi (J) per a cada un dels ports analitzats.

	Nre. T-RF	Shannon H'	Lloyd i Gheraldi J
Palma 1	25	2,82	0,88
Palma 2	42	3,18	0,85
Portixol	25	2,83	0,88
Arenal	30	2,84	0,84
Sant Jordi	43	3,15	0,84
Cala Figuera	26	2,74	0,84
Portocolom	36	2,90	0,81
Porto Cristo	47	3,18	0,83
Cala Rajada	36	2,94	0,82
Sant Pere	32	2,91	0,84
Can Picafort	36	2,91	0,81
Alcúdia	33	2,83	0,81
Pollença	43	2,94	0,78
Sóller	43	3,29	0,88
Andratx	28	2,83	0,85
Santa Ponça	29	2,68	0,79
Port Adriano	32	2,66	0,77
Portals	37	2,91	0,81
Cala Nova	32	2,96	0,85

2.3 Composició de les comunitats bacterianes marines estudiades mitjançant l'anàlisi de perfils T-RFLP de 16S rDNA a diferents ports de l'illa de Mallorca

A partir dels T-RF obtinguts per a cadascun dels ports estudiats s'analitzaren les semblances que poguessin presentar els diferents ports a partir del mètode NMDS utilitzant el coeficient de Bray-Curtis per al càlcul de similituds. El resultat es presenta a la Figura 51, on es pot veure que a pesar de ser ports de característiques tant diferents presentaven una certa semblança, ja que la majoria es troben relativament propers (els valors de similitud entre els perfils dels diferents ports eren comparables als obtinguts entre perfils de mostres de Port Adriano preses en diferents mesos). El perfil més diferenciats de la resta va correspondre a la mostra de Port Adriano, amb valors de similitud entre 15-20%. No es detectà una major similitud en els perfils de T-RFLP dels ports segons la seva ubicació, únicament els perfils d'alguns dels ports que es trobaven a la Badia de Palma presentaven una major relació entre ells (similituds superiors al 70%). Però amb valors de similitud d'aquest ordre també es trobaven relacionats ports de zones molt diferents de l'illa (per exemple els perfils dels ports d'Alcúdia, Portocolom, Portals i Santa Ponça). Els ports que presentaven majors diferències en els perfils de les seves comunitats bacterianes eren, a més de l'esmentat Port Adriano, Can Picafort i Sòller.

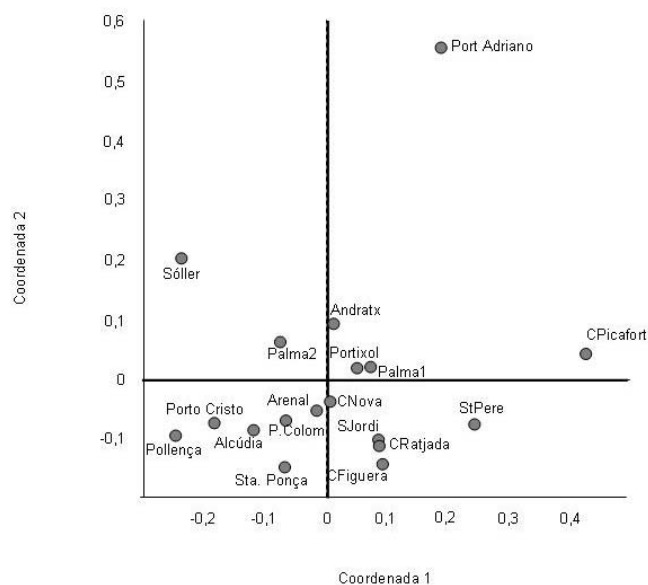


Fig. 51: Representació NMDS de les mostres dels diferents ports de Mallorca analitzats considerant tots els T-RF (*Alul* i *Cfol*). Valor d'estrès: 0,121.

2.4 Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de 16S rDNA de mostres dels ports de l'illa de Mallorca

El nombre de tots els T-RF detectats en els ports de Mallorca analitzats eren 137, 50 T-RF de l'extrem 5' digerits amb *AluI* i 19 amb *CfoI*, 20 T-RF de l'extrem 3' d'*AluI* i 18 amb *CfoI*.

A la Figura 52 es mostren l'ocurrència i abundància dels T-RF de l'extrem 5' del 16S rDNA obtinguts amb l'enzim *AluI* com a exemple de la variabilitat de les comunitats bacterianes en les mostres de diferents ports i s'inclou també la representació de dos T-RF C5 predominants en els perfils i que van poder ser identificats.

Com s'havia observat als resultats d'altres mostres analitzades en aquest treball els perfils de T-RFLP de les comunitats dels ports es diferenciaven en part degut a l'aparició de pics en un o pocs perfils, generalment en abundància baixa. No obstant, hi havia una sèrie de T-RF que apareixien als perfils de molts ports analitzats, tot i que en alguns casos amb diferent abundància relativa.

El T-RF 5' d'*AluI* més abundant i present a tots els ports, era el fragment A5-213,5 (Fig. 52), que va ser identificat en base a la col·lecció de T-RF de clons obtinguts a l'estudi de Port Adriano com un membre del grup *Roseobacter*. Les abundàncies d'aquest fragment oscil·laven entre un 16 i un 1%, el més abundant es trobava al port de Cala Rajada (16,41%) i el menys abundant al de Sóller (1,21%), sent aquí el T-RF més abundant el A5 198,1 amb un 3,17%. Analitzant els T-RF obtinguts amb l'extrem 3' d'*AluI* es comprovà que eren dues poblacions de *Roseobacter* les que es corresponien amb el T-RF A5-213,5 (T-RF A3-112,2 i A3-314,7). A la Figura 53 es mostra l'abundància relativa dels fragments A5 corresponents a aquestes dues poblacions i la suma de les abundàncies dels dos fragments A3. Com es veu a la figura l'abundància del T-RF A5-213,5 i de la suma dels dos fragments A3 eren molt semblants, per tant es confirmen que aquests dos fragments majoritàriament pertanyien al grup *Roseobacter*, el que permetia diferenciar dues poblacions.

Així doncs, s'observava una població del grup de *Roseobacter* present a tots els ports i que estava relacionada amb *Loktanella marincola* (T-RF A3-314,7). Aquesta població s'observava simultàniament amb la població definida pel T-RF A3-112,2 a la majoria dels ports, excepte al port de Pollença, Port Adriano i Santa Ponça, i generalment era la més abundant als ports on es trobaven ambdues poblacions.

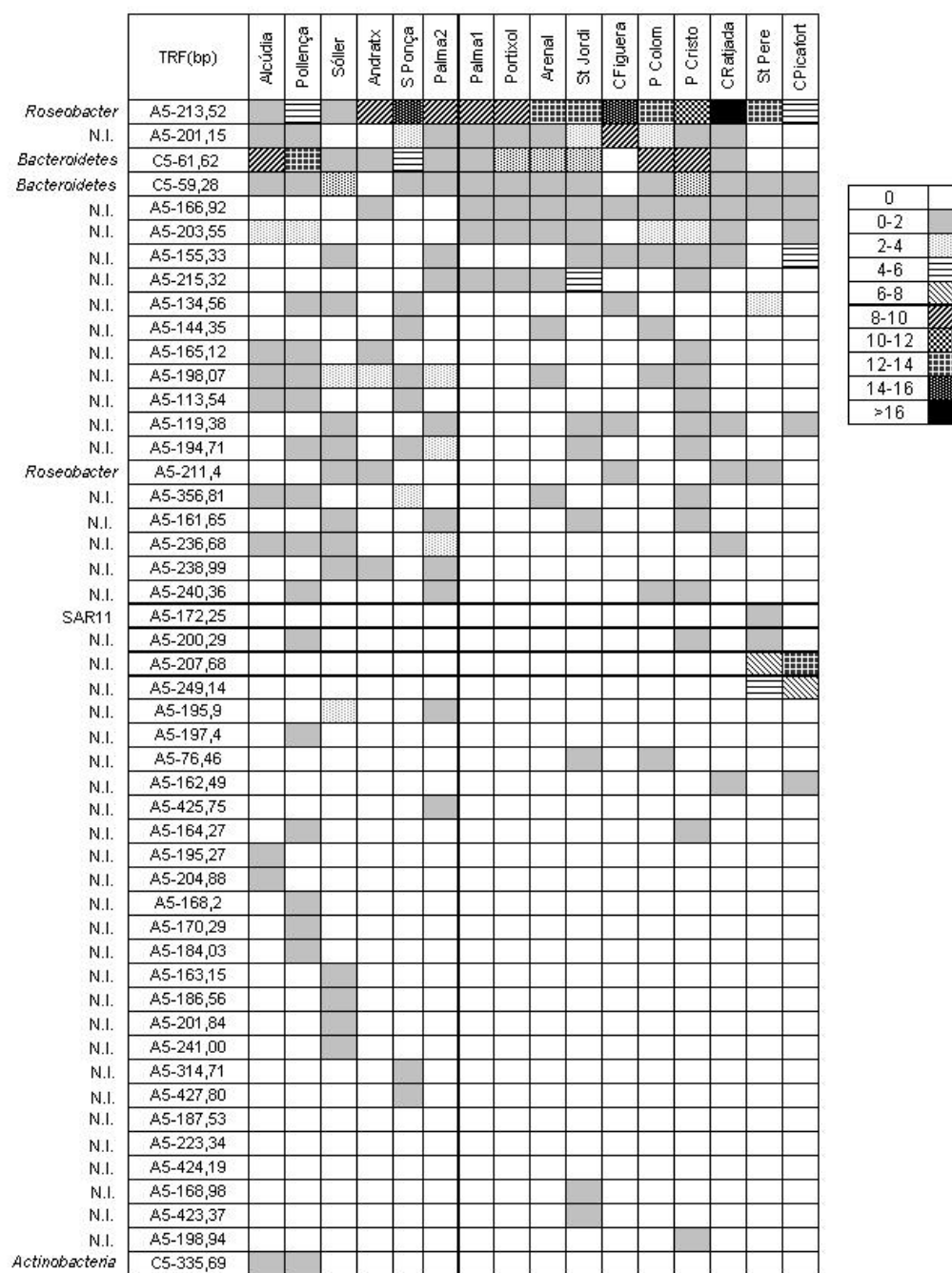


Fig. 52: Abundància relativa dels T-RF *Alul* de l'extrem 5' i 3 T-RF *Cfol* de l'extrem 5' obtinguts en els perfils de les mostres de Ports de Mallorca. N.I.: No identificat.

Aquesta població de *Roseobacter* s'havia observat de forma característica com a la població predominant a les mostres de Port Adriano (representada pel T-RF A5-213,8 a la Fig. 31). La població identificada amb T-RF A3-112,2, sols predominava als ports de Cala Figuera i Cala Ratjada. Als perfils de Port d'Alcúdia, tot i que apareixia, presentava uns valors d'abundància molt baixos. L'abundància d'aquesta població era superior als ports localitzats a la zona est i sud de l'illa de Mallorca però les diferències no eren estadísticament significatives. Aquesta població de *Roseobacter* s'havia observat com a predominant a aigües de la badia i de la platja a l'estudi de Port Adriano (T-RF A5-213,2 a la Fig. 31) i ambdues poblacions es detectaven també al Port de Palma (Fig. 47).

En alguns ports analitzats es va poder identificar una tercera població pertanyent al grup *Roseobacter* però sempre amb abundàncies molt baixes. Aquesta població, representada pel T-RF A5-211,4 s'observà als ports de: Sóller, Colònia de Sant Pere, Cala Rajada, Cala Figuera, Cala Nova i Andratx (Fig. 52), s'havia observat prèviament a les mostres de la badia a l'estudi de Port Adriano i era una població abundant a les mostres de l'estudi realitzat al Port de Palma a la primavera del 2002 (Fig. 47).

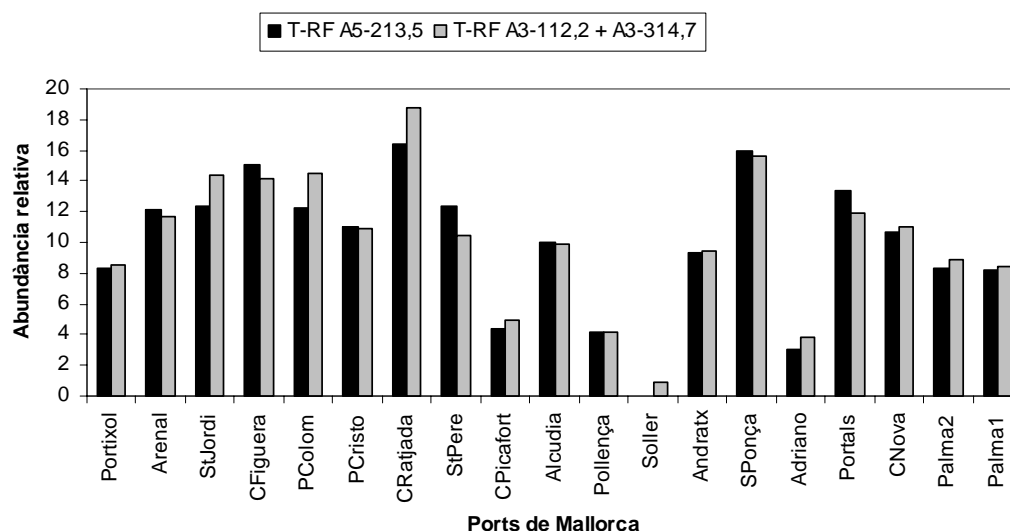


Fig. 53: Suma d'abundàncies relatives de T-RF 3' d'*AluI* 112,2 i 314,7 i abundància relativa T-RF A5-213,5 identificatius de dues poblacions pertanyents al grup *Roseobacter*.

El segon T-RF 5' d'*AluI* més detectat entre aquestes mostres portuàries era el 201,2 present a 15 dels 20 ports, arribant a valors importants al port de Cala Figuera (8,43%). Aquest T-RF no es va poder identificar però també es trobava entre els

fragments abundants detectats al Port de Palma (est. 1, Fig. 47) i a l'estudi de comunitats realitzat a Port Adriano (Fig. 31) amb major freqüència i abundància a mesura que disminuïa la distància al port.

A tots els ports estudiats excepte el de Cala Figuera es van identificar dues poblacions de *Bacteroidetes* (Fig. 52). La població representada pel T-RF C5-59,3 estava present a tots els ports on s'observaren *Bacteroidetes* excepte el d'Andratx, però només presentava abundàncies superiors al 2% al Port de Sóller. La segona població en freqüència d'aparició als perfils dels diferents ports era la representada pel T-RF C5-61,6, que en general era la més abundant, essent considerablement abundant als perfils del Port de Pollença, Alcúdia, Porto Cristo i Portocolom (entre el 8 i el 12%) (Fig. 52). Es va observar que l'abundància del T-RF C5-61,6 estava positivament relacionada amb la concentració de clorofil·la a l'aigua (Rho de Spearman 0,615, $p < 0,01$, $n = 19$). Totes aquestes poblacions de *Bacteroidetes* es van observar també a l'estudi realitzat de Port Adriano (Fig. 31), principalment a les mostres de port i platja. A l'estudi del Port de Palma de la primavera del 2002, tot i que es van observar fragments, especialment C5, que podrien ser compatibles amb aquestes poblacions no es va poder arribar a la seva identificació segons els criteris emprats per la inferència.

Finalment, en mostres dels ports de Pollença i Alcúdia es va identificar una població relacionada amb *Actinobacteria* (T-RF C5-335,7) que s'havia observat esporàdicament a l'estudi de Port Adriano i que es considerarà d'origen al·lòcton. A la mostra de la Colònia de Sant Pere es va observar la presència d'una població de SAR11 (representada pel T-RF A5-172,3) en abundància baixa.

3. ESTUDI DE LES COMUNITATS BACTERIANES A LA PLATJA DE PALMA

3.1 Caracterització de l'àrea de mostreig de la Platja de Palma

Els paràmetres fisicoquímics analitzats a la Platja de Palma durant el període de mostreig (de març a desembre de 2003) varen ser la temperatura, la salinitat i la conductivitat.

La variació de la temperatura de l'aigua (Fig. 54) va ser la típica d'una estació costanera del mar Mediterrani, temperatures màximes a l'estiu pròximes als 30°C i molt suaus (15°C) a la primavera i tardor.

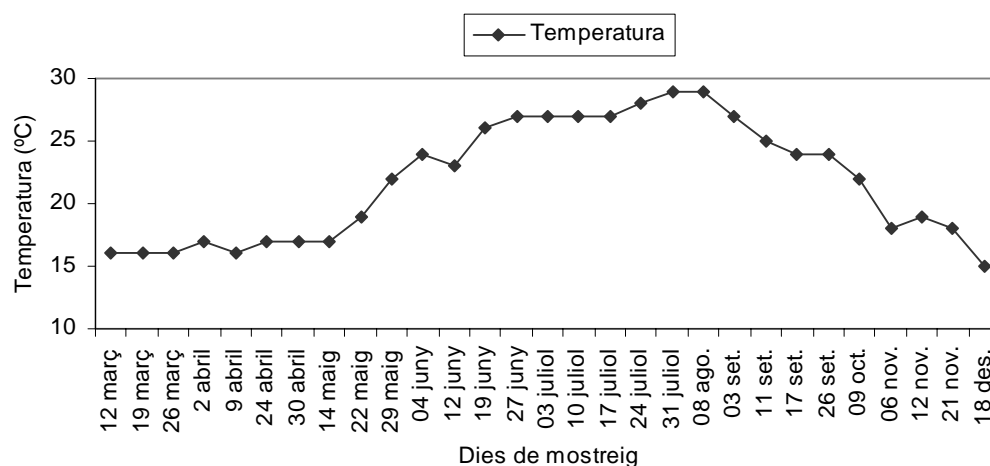


Fig.54: Variació de les temperatures de l'aigua del mar a l'estació de mostreig de la Platja de Palma.

La conductivitat i salinitat presentaven un comportament molt semblant (Fig. 55), del qual el més destacable era una important disminució d'ambdós paràmetres de manera puntual a alguns mostresos d'estiu que posteriorment es recuperava.

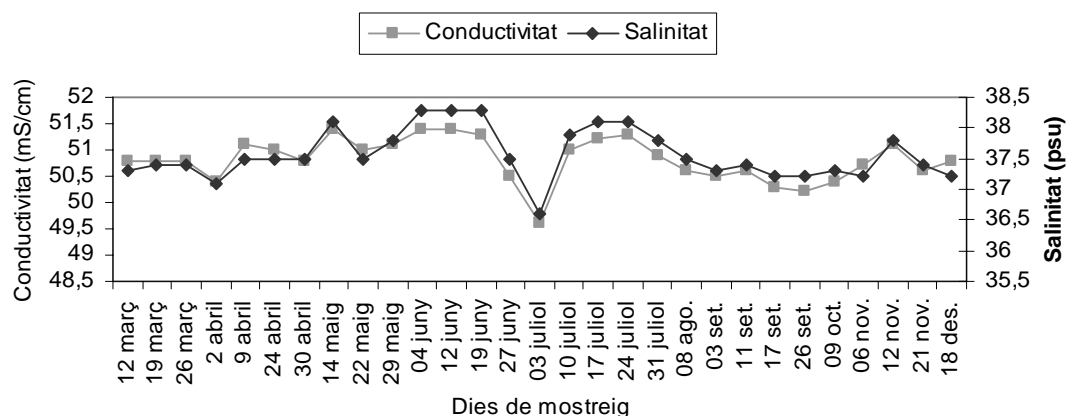


Fig.55: Variació de salinitat i conductivitat al llarg del període de mostreig.

3.2 Diversitat global de les comunitats bacterianes analitzades

La diversitat bacteriana es va analitzar mitjançant T-RFLP de gens per a 16S rRNA tal i com s'ha descrit a l'apartat 4 de Material i Mètodes. A les 26 mostres analitzades a la Platja de Palma es detectaren 178 T-RF, dels quals 87 corresponien a l'enzim *AluI* (47 de l'extrem 5' i 40 de l'extrem 3') i 91 a l'enzim *CfoI* (49 de l'extrem 5' i 42 de l'extrem 3'). El nombre de fragments que presentaven una abundància relativa major a l'1% eren 104 (58%).

Es determinaren els índexs de diversitat considerant els T-RF 5' d'*Alul* que es presenten a la Taula 16 per a cada dia de mostreig. La detecció del major nombre de T-RF es produïa a les mostres de primavera i de la tardor, apareixent una important disminució a l'estiu des de finals de juny fins a finals de setembre. La major diversitat observada a partir dels índexs de Shannon es detectava als mesos de finals de la primavera i finals de la tardor, i a l'igual que la major abundància de T-RF, l'estiu era l'època en que a la Platja de Palma hi havia una menor diversitat poblacional bacteriana. La uniformitat identificada amb l'índex de Lloyd i Gheraldi era molt variable; la uniformitat de principis de primavera i tardor era la més baixa, mentre que als mesos d'estiu generalment presentaven una uniformitat més elevada. El rang de variació d'ambdós índexs (H' i J) era major per a les mostres corresponents a l'estiu (Fig. 56).

Taula 16: Valors de nombre de fragments, índex de Shannon (H') i de Lloyd i Gheraldi (J) de les mostres de Platja de Palma.

Mesos	Dies	Nre. T-RF	Shannon H'	Lloyd i Gheraldi J
Març	12	16	2,03	0,73
	19	16	1,91	0,69
	26	6	0,87	0,49
Abril	2	13	1,79	0,70
	9	9	1,95	0,89
	24	9	2,14	0,97
	30	15	2,57	0,95
Maig	14	8	1,70	0,82
	22	10	2,12	0,92
	29	13	2,16	0,84
Juny	4	11	2,00	0,83
	19	13	2,08	0,81
	27	4	0,88	0,63
Juliol	3	2	0,69	1,00
	10	13	2,00	0,78
	17	5	1,54	0,96
	24	7	1,73	0,89
Agost	8	6	0,85	0,48
Setembre	11	6	1,13	0,63
	17	9	0,79	0,36
	26	4	0,58	0,42
Octubre	9	9	1,65	0,75
Novembre	12	16	2,35	0,85
	6	17	2,10	0,74
	21	17	2,54	0,90
Desembre	18	15	2,32	0,86

La diversitat (H') observada a les mostres de la Platja de Palma era inferior a l'observada a les mostres de la platja (est. 13) de l'estudi realitzat a Port Adriano (valors mitjans de H' de 3,47), però en ambdós sistemes s'observava una major

variabilitat en els valors de diversitat de les mostres d'estiu, amb l'increment en l'amplitud del rang interquartil dels valors de H' i J (Fig. 28 i 29).

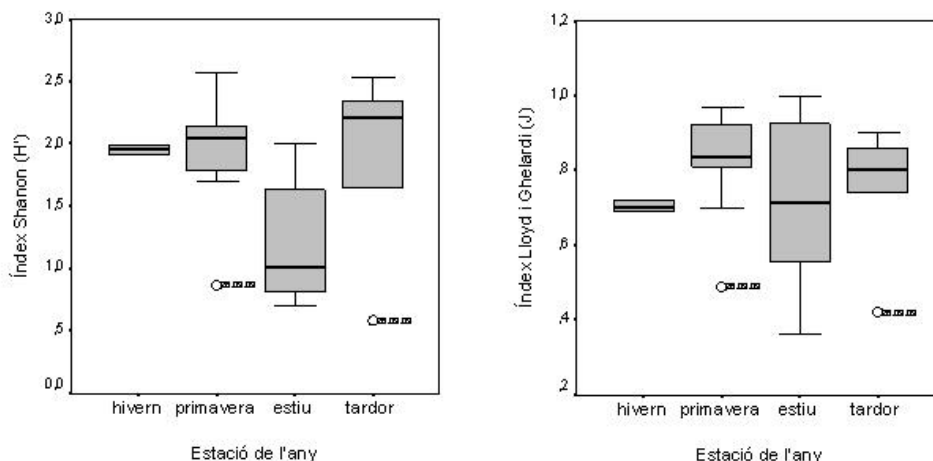


Fig.56: Diagrama de caixes dels índexs de Shannon (H') i Lloyd i Gheraldi (J) per a cada estació de l'any.

3.3 Comparació de la composició de les diferents comunitats bacterianes a la Platja de Palma mitjançant l'anàlisi de perfils T-RFLP

Les similituds entre els perfils de T-RFLP obtinguts per les diferents mostres es van determinar utilitzant el coeficient de Bray Curtis a partir de les dades d'abundància de tots els fragments obtinguts i es va calcular un dendrograma mitjançant UPGMA.

Els valors de similitud baixos entre els perfils indicaven que les comunitats bacterianes a les mostres analitzades eren molt variables. Encara que aquests valors eren semblants als valors de similitud observats en la comparació de les mostres de port i platja de l'estudi realitzat a Port Adriano i inferiors als que s'obtenien per a la majoria de les mostres de la badia de l'esmentat estudi. Les comunitats bacterianes a la Platja de Palma eren molt dinàmiques com es pot veure a la Figura 57 que mostra els valors de similitud (coeficient de Bray-Curtis) entre perfils de T-RFLP obtinguts per mostres consecutives en el temps. Tan sols el perfils de les mostres del 22 i el 29 de maig presentaven valors de similitud entre elles relativament elevats (69%). En la majoria dels casos la similitud entre perfils de mostres consecutives tenien valors de similitud entre el 45 i el 50%. Això indicaria que en aquestes comunitats es produïen canvis poblacionals considerables en intervals de temps d'una setmana. En determinats moments, com per exemple entre el 24 i el 30 d'abril, entre el 24 de juliol i el 8 d'agost o entre l'11 i el 17 de setembre es produïren canvis importants en els

perfils de T-RFLP com indiquen els valors baixos de similitud entre aquestes parelles de mostres (36, 30 i 34%, respectivament).

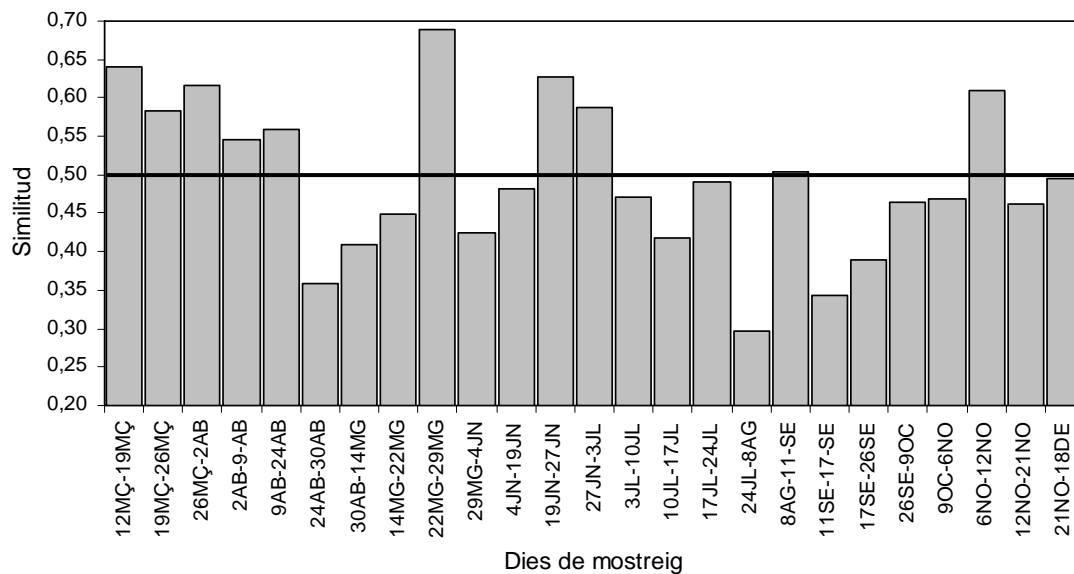


Fig.57: Valors de similitud entre mostres consecutives en el temps durant el període de mostreig. La línia marca el valor de 50% de similitud.

A la Figura 58 es presenta el dendrograma obtingut per als perfils de T-RFLP de les mostres de la Platja Palma després de realitzar una transformació logarítmica dels valors d'abundància relativa dels T-RF. El dendrograma mostrarà l'agrupació dels perfils en tres grups principals (A-C), amb valors de similitud entre ells inferiors al 40-45%. El primer dels grups (A) comprenia perfils de les mostres de primavera, algunes mostres d'estiu i del inici de la tardor. Totes les mostres de primavera del grup, excepte la mostra del 30 d'abril, formaven un subgrup de perfils juntament amb una mostra d'estiu (10 de juliol) amb valors de similitud superiors al 55%. La resta de perfils en el grup A presentaven valors de similitud més baixos, excepte els perfils corresponents a les mostres de l'11 de setembre i el 9 d'octubre que eren els més semblants de tot l'estudi (similitud del 80%). El segon dels grups del dendrograma (B) comprenia les mostres que es recolliren al inici (principis de març del 2003) i al final de l'estudi (mostres de novembre i desembre del 2003). Aquests resultats semblarien indicar una certa coherència de les comunitats bacterianes en aquest ecosistema durant el període de finals de tardor i hivern. Finalment, el tercer grup al dendrograma (C) era el grup menys relacionat amb la resta (similitud inferior al 40%) i estava format principalment per mostres d'estiu (juliol, agost i setembre), que són les mostres que tenien una diversitat menor (Taula 16), juntament amb dues mostres de primavera (14

maig i 6 de juny). La mateixa topologia bàsica en tres grups de perfils s'obtenia si es realitzaven els càlculs amb els valors d'abundància relativa sense realitzar la transformació logarítmica però els valors de similitud intragrup eren menors.

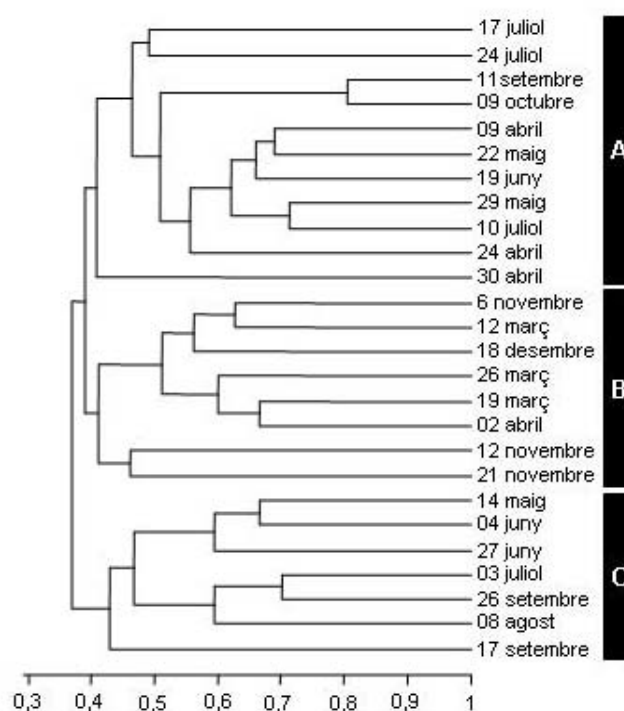


Fig.58: Dendrograma dels perfils de T-RF obtinguts de l'estudi de la Platja de Palma.

Els perfils de la Platja de Palma obtinguts es van comparar amb els de la mostra de la platja (estació 13) a l'estudi de Port Adriano mitjançant el càlcul de valors de similitud (coeficient de Bray-Curtis) i de dendrograms de UPGMA per determinar les semblances entre comunitats bacterianes a ambdues platges. Majoritàriament els perfils de T-RFLP es separaven en dos grups amb valors de similitud baixos entre ells (inferiors al 30%) en relació a la localització de la platja, un grup contenia principalment perfils corresponents a la Platja de Palma on es trobaven els perfils de les mostres de maig i juny del 2002 de l'estació de la platja de port Adriano intercalades i un altre grup amb la majoria de perfils de mostres de la platja de Port Adriano i els perfils de la Platja de Palma corresponents a finals de tardor, novembre i desembre (Fig. 59). Aquests resultats estaven d'acord amb les diferències en diversitat esmentades anteriorment i indicarien que les diferències entre comunitats d'aquestes dues platges són més importants que les variacions estacionals que es produïen en les comunitats bacterianes de cadascuna d'elles.

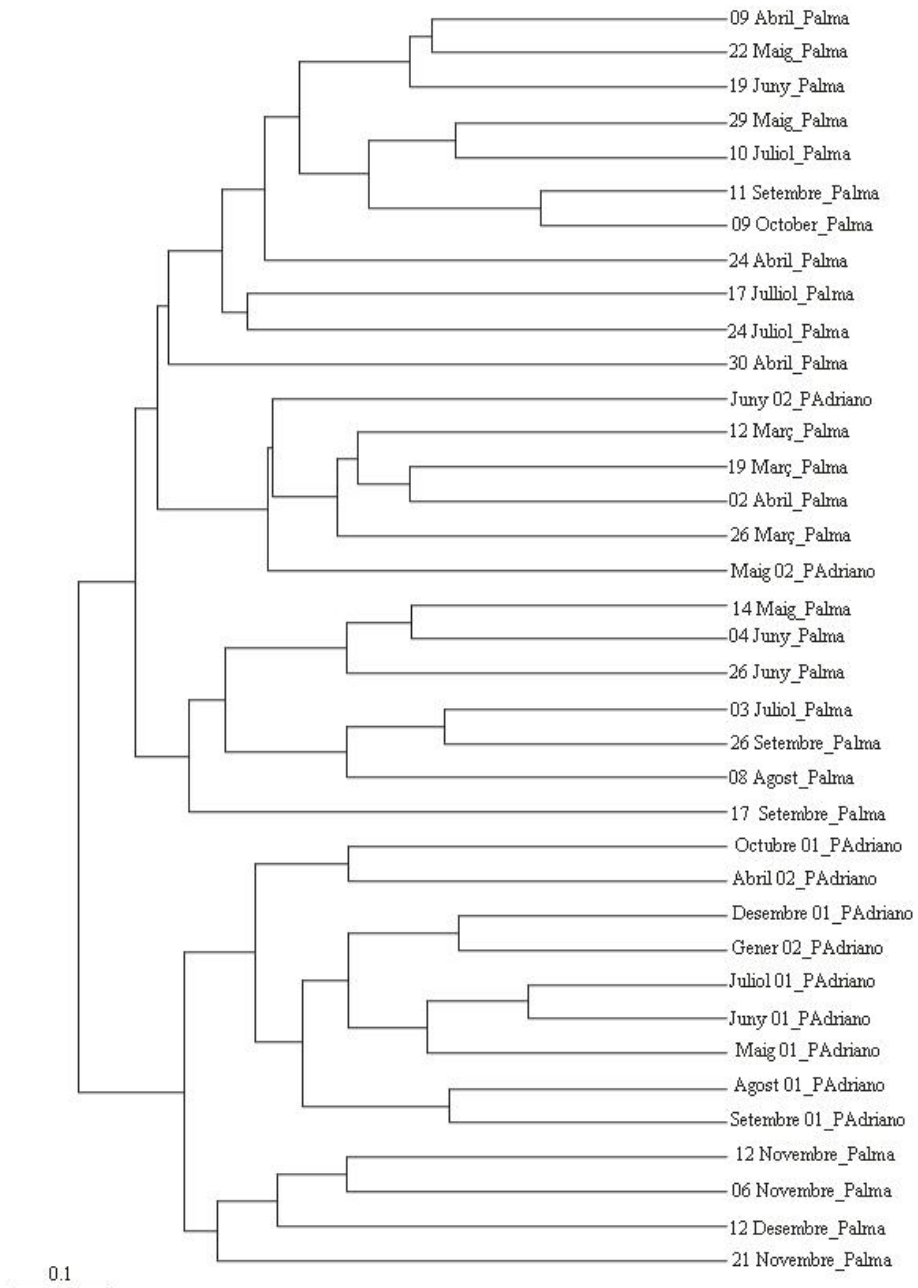


Fig.59: Dendrograma dels perfils de T-RF obtinguts de l'estudi de la platja de Palma i els perfils de l'estació de la platja (est. 13) de port Adriano.

3.4 Identificació de les poblacions bacterianes corresponents a T-RF predominants als perfils de T-RFLP de mostres de la Platja de Palma

Malgrat les diferències en els perfils de T-RFLP de mostres de la Platja de Palma en comparació amb altres mostres com les de la platja de l'estudi de Port Adriano (est. 13), es va observar que hi havia un total de 101 T-RF comuns a tots dos ambients (31 T-RF A5, 27 A3, 26 C5 i 17 C3); 77 T-RF observats a les mostres de Palma únicament (16 A5, 13 A3, 23 C5 i 25 C3) i 89 observats a les mostres de la platja de Port Adriano exclusivament (29 A5, 14 A3, 35 C5 i 11 C3). No obstant, els T-RF que s'observaven amb major freqüència i que presentaven majors abundàncies a les mostres de la Platja de Palma eren la majoria T-RF que apareixien en els altres sistemes estudiats en aquest treball.

La Figura 60 mostra la variació en l'abundància relativa de T-RF obtinguts amb l'enzim *AluI* corresponents a l'extrem 5' del gen 16S rRNA, com a exemple del que s'observava pels altres fragments. L'únic T-RF que apareixia a totes les mostres era el fragment A5-211,2 i seguidament el T-RF A5-213,4, detectat a 23 de les 26 mostres analitzades. Com es pot veure a la Figura 60 hi havia un nombre considerable de T-RF que apareixien en un únic perfil. També s'observava una variació temporal en l'abundància dels T-RF.

Amb la informació de la base de dades de T-RF obtinguda a partir de clons a l'estudi de Port Adriano es va intentar identificar les poblacions més rellevants presents a la Platja de Palma, tal i com s'havia fet per les mostres de Port Adriano (Fig. 31). Es van poder identificar les dues poblacions representades pels T-RF més abundants esmentades abans (T-RF A5-211,23 i A5-213,4), que pertanyien al grup *Roseobacter* (classe α -*Proteobacteria*).

La població de *Roseobacter* representada pel T-RF A5-213,4 s'observà també a l'estudi de Port Adriano (Fig.31), però en aquell cas va ser possible diferenciar dues poblacions de mides de T-RF A5-213,2 i A5-213,8, la primera d'elles més abundant a mostres de la badia i la segona a mostres de port i platja. Aquestes dues poblacions també es diferenciaven per la mida dels corresponents T-RF *AluI*-3'. Així, considerant els T-RF 3' d'*AluI* dels perfils de les mostres de la Platja de Palma es comprovà que eren dues les poblacions de *Roseobacter* identificades amb el T-RF A5-213,4: una identificada amb el T-RF A3-112,2 i que correspondria a la població de *Roseobacter* detectada a la badia de l'estudi de Port Adriano pel T-RF A5-213,2, i l'altre amb el T-RF A3-314,8 que correspondria a la població de *Roseobacter* detectada al port i platja

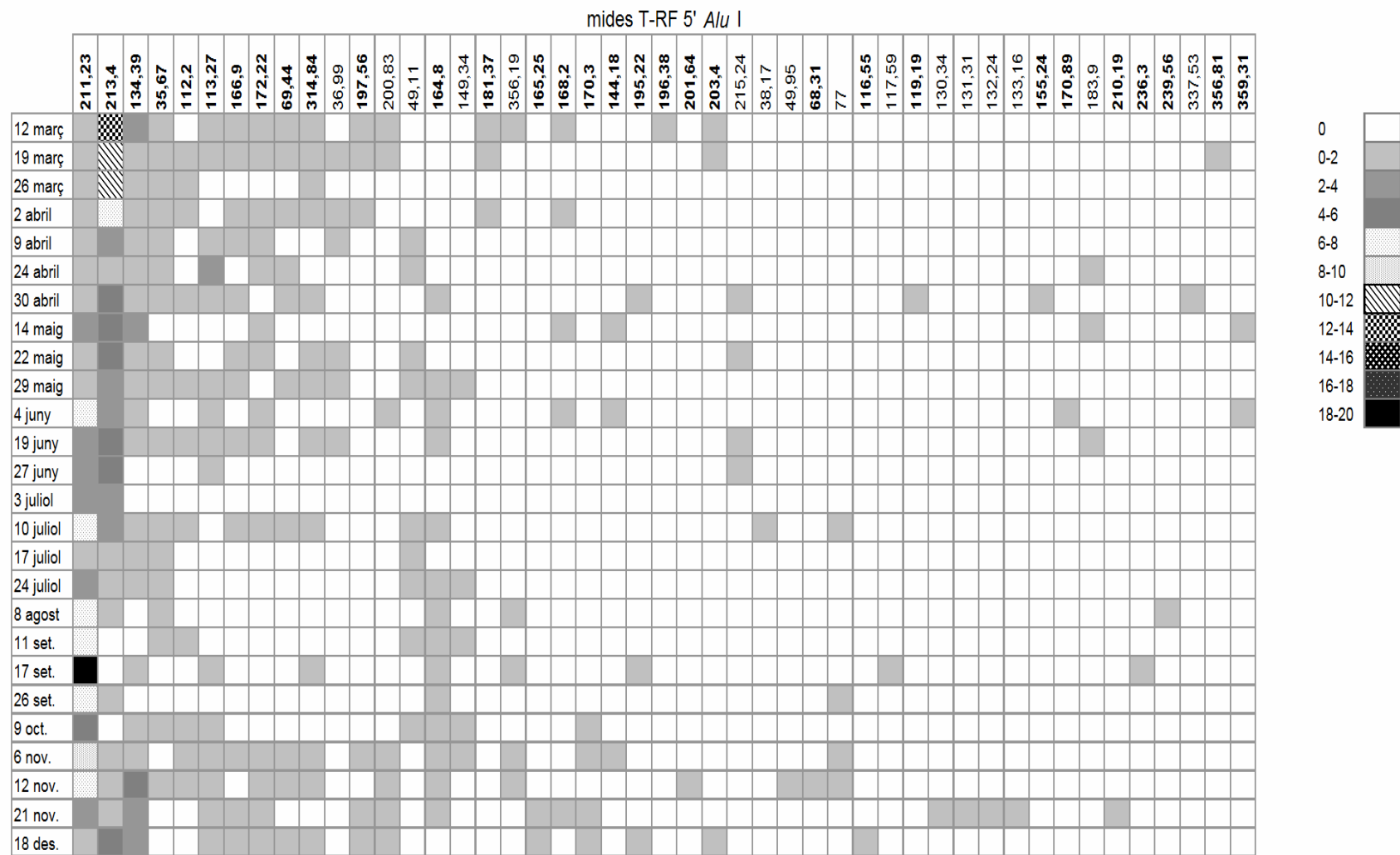


Fig.60: Abundància relativa de T-RF 5' *Alu* I a la Platja de Palma. Els T-RF que es presenten en negreta es detectaven a la comunitat de Port Adriano (est.13).

d'aquell estudi amb T-RF A5-213,8. Així doncs el predomini de *Roseobacter* a la Platja de Palma era absolut però es repartia entre tres poblacions del mateix grup, encara que aquestes presentaven distribucions temporals diferents (Fig. 61). Les poblacions identificades amb T-RF A5-213,4 eren les més abundants des de març fins a l'arribada del mes de juny, mentre que no es detectaren valors abundants de la població T-RF A5-211,2 fins el mes de maig. Al mes de juny amb una clara presència de la població de T-RF A5-211,2, s'anava alternant la predominança d'ambdues poblacions, fins que al mes de juliol la població més abundant era la identificada amb T-RF A5-211,2, que es mantenia amb abundàncies importants fins al final del mes de novembre i pràcticament desapareixia al mes de desembre, quan tornava a augmentar l'abundància del T-RF A5-213,4.

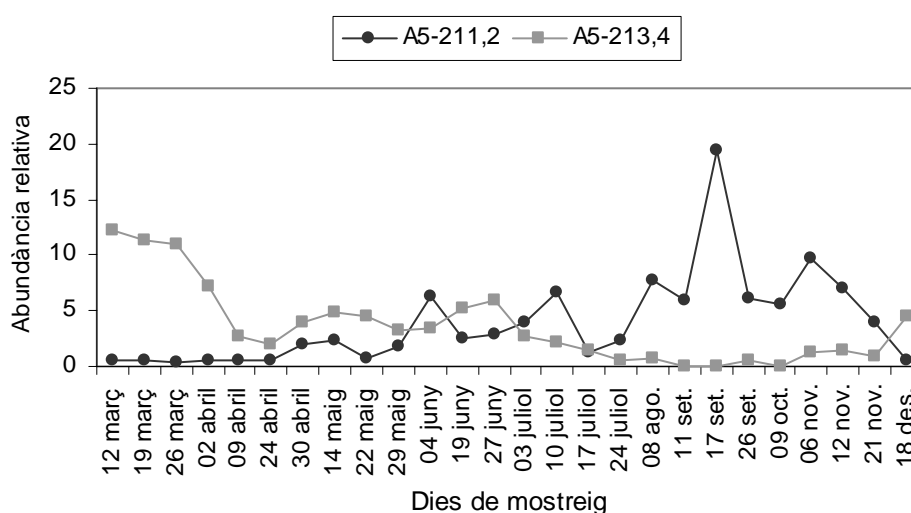


Fig.61: Variació temporal de les abundàncies relatives del grup *Roseobacter* (T-RF A5-211,2 i A5-213,4).

En tots els sistemes estudiats en aquest treball (Port Adriano, Port de Palma i Platja de Palma) en anys diferents (2001, 2002 i 2003) el comportament temporal de les poblacions de *Roseobacter* era el mateix: al començament de l'estiu (aproximadament al juny, depenent de l'any) les poblacions predominants que fins aquell moment eren les identificades amb el T-RF 5' d'A/lul 213 (en el cas de Port Adriano es discriminaven les dues poblacions amb T-RF diferents A5-213,2 i A5-213,8) disminuïen les seves abundàncies relatives i augmentaven les del T-RF A5-211,2. És interessant destacar també que en determinats moments es produïen oscil·lacions considerables en les abundàncies d'aquestes poblacions en una escala de temps

setmanal; el cas més extrem va ser la variació en l'abundància del T-RF 211,2 en el període comprés entre l'11 i el 26 de setembre (Fig. 61).

Apart de les poblacions de *Roseobacter* es van poder identificar en alguns perfils de T-RFLP de la Platja de Palma poblacions de *Bacteroidetes* representades pels T-RF C5-59,4 i C5-61 (Fig. 62). Aquestes dues poblacions de *Bacteroidetes*, que també s'observaren en l'estudi de Port Adriano (Fig. 31), apareixien més freqüentment als perfils de primavera i tardor i no s'observaven als perfils de les mostres d'estiu avançat. La presència d'ambdues poblacions de *Bacteroidetes* solia coincidir als diferents mostrejos, llevat d'algunes ocasions puntuals, com era al principi de la primavera on tan sols es detectava la població representada per T-RF C5-59,4. Al final de la tardor es detectà una disminució progressiva d'ambdues poblacions. En general doncs, el comportament temporal de les dues poblacions de *Bacteroidetes* analitzades a la Platja de Palma era molt semblant.

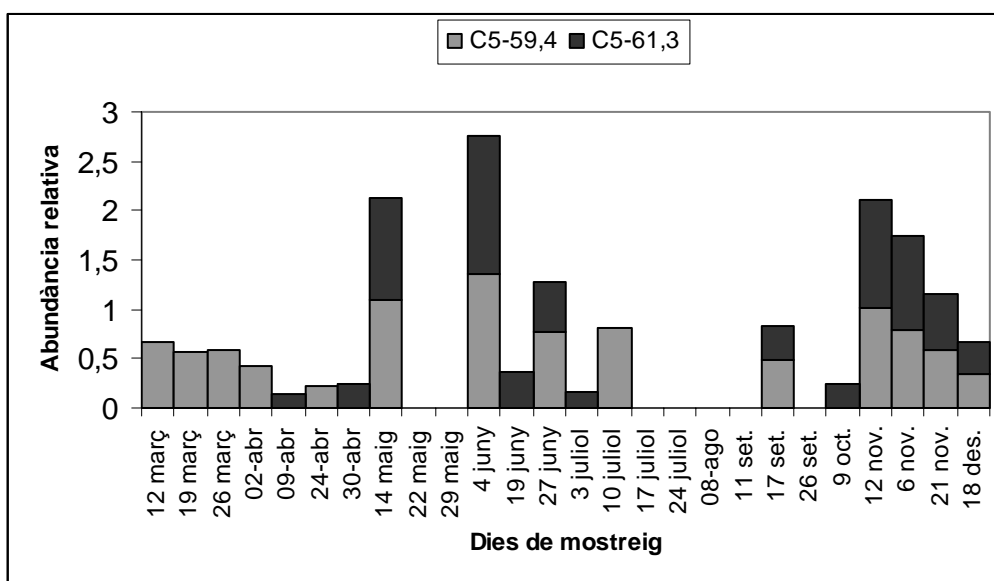


Fig.62: Abundància relativa de dues de les poblacions del grup de *Bacteroidetes* (T-RF C5-61,3 i C5-59,4) detectades.

DISCUSSIÓ

Aquest treball descriu la diversitat bacteriana marina costera a zones afectades pels usos recreatius del litoral que tenen lloc als ports i a les platges. En aquestes zones d'impacte antropogènic sobre el medi natural, tant les comunitats bacterianes com les condicions fisicoquímiques de l'entorn presenten un gran nombre de canvis a l'espai i al temps. Aquests canvis es poden veure molt fàcilment amb l'aplicació de Sistemes d'Informació Geogràfica (SIG). Aquesta eina no tan sols representa geogràficament l'evolució d'un paràmetre, sinó que analitza mitjançant la interpolació de les dades, com es produeixen aquests canvis a una superfície continua. Així doncs, la combinació de les tècniques de Sistemes d'Informació Geogràfica i de dades biològiques és molt útil per a la creació de bases de dades mediambientals (Stoner *et al.*, 2001) i també per a estudis d'avaluació ambiental (Kitsiou and Karydis, 2000; Kesley *et al.*, 2004; White *et al.*, 2004). A més, pot resultar una eina molt valuosa per a preveure amb anticipació l'extensió d'un possible impacte i per entendre la dinàmica de comunitats bacterianes. L'anàlisi amb SIG és possible gràcies a la ubicació de les estacions les quals han d'estar homogèniament repartides per tota la superfície que es vol analitzar. Per a una millor anàlisi del grau d'afectació de les zones d'impacte, port i platja, es distribuïren les estacions allunyant-se linealment d'aquestes. La distribució de punts de mostreig sobre la superfície total a estudiar és important, perquè en ambients planctònics costaners hi ha tota una sèrie d'atributs del sistema (p.e. transport horitzontal de l'aigua, mescla vertical, temps de residència, règim de vents, etc.) que són molt importants per determinar quin serà l'impacte potencial en la biologia dels organismes (Keough i Black, 1996; Cloern, 2001).

D'altra banda, l'àmplia escala temporal (cicle anual) en el que es realitzà l'estudi de Port Adriano permeté apreciar quina era la variació estacional de les comunitats microbianes a les diferents àrees d'impacte. Així doncs, es pogué caracteritzar la diversitat bacteriana i obtenir una acurada descripció de l'entorn mitjançant l'anàlisi dels paràmetres físics, químics i biològics tant en el temps com en l'espai. La utilització de tècniques de SIG aplicades al nostre estudi de comunitats bacterianes marines va ser molt útil perquè permetia una interpretació extremadament visual de la informació ambiental i microbiana obtinguda en el seu context geogràfic.

La zona de mostreig de Port Adriano presentava dues àrees clarament diferenciades, tant per les seves característiques fisicoquímiques com per les poblacions bacterianes que en elles es trobaren. Una d'aquestes àrees era la influenciada pel port i l'altra la zona de la badia més allunyada de la costa, entre elles es detectà una zona de transició on es trobava situada la platja. Els paràmetres

fisicoquímics i biològics que les caracteritzaven són atribuïts en gran part per la influència costanera i l'ús del litoral que té lloc a tota la zona. Els resultats obtinguts es van poder comparar amb altres indrets de l'illa (Port de Palma, Platja de Palma i Ports de Mallorca) on l'impacte sobre la zona era produït també per un port o un platja i la descripció dels paràmetres i de les comunitats bacterianes era molt semblant a les diferents estacions de Port Adriano. Les característiques morfològiques, ambientals i antropogèniques de cadascuna d'aquestes altres zones de Mallorca manifestaven diferències entre els valors dels paràmetres analitzats, però sempre presentaven una coherència temporal i espacial amb els resultats del mostreig de Port Adriano i les característiques comunes de pertànyer al Mar Mediterrani.

Els paràmetres fisicoquímics analitzats van ser els que primer varen mostrar una clara diferenciació espacial entre les estacions més afectades per les zones d'impacte i les de menys afectació. Així, l'estació més interior del port (est.18) a la zona de Port Adriano era un sistema d'aigües estancades on la freqüència de renovació de l'aigua és menor. El port al ser un àmbit humanitzat presentava unes característiques fisicoquímiques i biològiques molt diferenciades. La concentració de compostos hidrofòbics, de clorofil·la *a* i el recompte de cèl·lules tant totals com actives presentaven els valors màxims a dins la zona portuària. Cal realçar també la influència de la temperatura en aquests paràmetres, remarcant l'accentuada estacionalitat del clima mediterrani la qual provoca una variació tèrmica de l'aigua del mar de 13°C entre l'estiu i l'hivern (Duarte *et al.*, 1999). Com per exemple al port on, contràriament al que en principi es podria esperar, la concentració de compostos hidrofòbics era major a l'hivern, en un mes on l'activitat portuària era menor. Una de les possibles explicacions per les quals es pot donar aquest fenomen era el nombre d'hores d'irradiància solar i les temperatures més elevades a l'estiu, produint un augment de l'evaporació de l'aigua i amb ella l'evaporació dels components volàtils que es troben a la superfície, com alguns hidrocarburs, o bé per la fotòlisi d'aquests compostos. Per a reforçar aquestes hipòtesis i comprovar que no es tractava d'un fet puntual calculàrem la correlació de les diferents temperatures de la mar i el nombre d'hores de sol amb la concentració de compostos hidrofòbics al llarg de 14 mesos dels anys 2001 i 2002, obtenint correlacions significatives ($p < 0,01$) en ambdós casos. Un altre factor que influeix en la pèrdua per volatilització d'hidrocarburs, especialment els de més baix pes molecular, en aigües de port és la influència del vent i de la brisa marina, tal com es va demostrar en un estudi realitzat al port del Masnou, Barcelona (Pérez *et al.*, 2003). Aquest estudi va demostrar que el flux de volatilització d'hidrocarburs a l'estiu seguia

un patró diari, relacionat amb el règim de brisa marina que s'establia a la zona, amb vents diürns de mar cap a terra i en sentit contrari durant la nit. Aquests tipus de règim de vent que es produeix als mesos d'estiu com a conseqüència de les diferències tèrmiques entre mar i terra és predominant a la costa sud-oest de Mallorca i, encara que es tracta de vents dèbils, la seva persistència (Basterretxea *et al.*, 2005) ens podria ajudar a explicar la disminució d'hidrocarburs als mesos de més calor. D'altra banda, la menor concentració d'hidrocarburs observada al mes d'agost també podria estar relacionada amb un increment de la degradació d'aquests compostos per part de microorganismes a l'estiu. En qualsevol cas, és important tenir en compte que la quantitat d'hidrocarburs en zones costaneres depèn d'altres factors diferents del tràfic marítim, com ara la deposició atmosfèrica. Així, Lipiatou i col·laboradors (1997) van mostrar que la concentració atmosfèrica d'hidrocarburs aromàtics policíclics era major a l'hivern.

D'altra banda, la temperatura de l'aigua és una variable important que permet explicar l'augment del nombre de microorganismes a l'estiu (Duarte *et al.*, 1999). Això es demostra amb la disminució del nombre de cèl·lules a l'hivern, molt considerable tant als recomptes per DAPI com per FISH, així com amb la disminució de la concentració de clorofil·la (Fig. 22, 24 i 26). Es comprovà que hi havia una correlació positiva significativa tant entre la temperatura i el nombre de cèl·lules totals ($p < 0,01$) com entre la temperatura i el percentatge de cèl·lules actives ($p < 0,05$). L'increment del nombre de cèl·lules microbianes a l'aigua va ser especialment important a la platja i al port, les zones on hi ha un menor recanvi de l'aigua i per tant, on la influència de l'aport de nutrients des de la costa seria major. Increments en les poblacions microbianes durant l'estiu en aigües de ports també han estat descrits a la literatura (Schauer *et al.*, 2000). Aquest efecte combinat de la temperatura, els nutrients i la taxa de recanvi de l'aigua es manifestà també en els valors de concentració de clorofil·la, un paràmetre integrador que permet avaluar l'estat tròfic de l'aigua, ja que en aquest estudi no s'han quantificat nutrients importants com ara nitrogen i fòsfor a l'aigua. Els valors de clorofil·la obtinguts en aquest estudi són semblants als que s'han descrit en altres zones del litoral de Mallorca (Basterretxea *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2004; Puigserver *et al.*, 2002) i de la costa catalana (Estrada *et al.*, 1999; Schauer *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2003). Com s'observà a Port Adriano i com també s'ha descrit a altres ports, els valors de clorofil·la són superiors als que es troben a la costa (Puigserver *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2000), i són més elevats a l'estiu. Però cal destacar també la influència de la costa sobre la clorofil·la entre les mostres de la

badia, que s'aprecia amb facilitat amb l'aplicació dels Sistemes d'Informació Geogràfica. La concentració de clorofil·la *a* que generalment es detectava a concentracions baixes a la badia presentava al mes de desembre un augment de la seva abundància, sent a les estacions més properes a la costa on s'elevaven els valors de clorofil·la (Fig. 21B). Aquest fenomen s'observa de forma característica en aigües del Mediterrani nord-occidental a la tardor (Duarte *et al.*, 1999).

Altres paràmetres com la salinitat i la conductivitat presentaven al port canvis inesperats, principalment a l'estació 18 la més interna i propera a la zona de reparacions de vaixells de Port Adriano. Aquesta variabilitat era produïda per la disminució d'ambdós paràmetres en mesos de baixes temperatures, molt probablement induït per l'abocament d'aigua dolça provinent de l'escar. A l'estació 11 també es produïen fenòmens puntuals de disminució dels valors de conductivitat i salinitat, i la disminució del pH a les estacions veïnes 8 i 9, properes al dic de Port Adriano. Aquestes variacions molt probablement tenien lloc per vessaments localitzats d'aigua dolça.

Cal destacar que les variacions dels paràmetres fisicoquímics a l'espai de Port Adriano concorden amb l'evolució de les corrents superficials influenciades pels vents predominants (SW) i que circulen vorejant la costa. Així doncs, baix condicions climatològiques normals es podia preveure que els impactes provocats per la platja i el port es manifestarien primer a l'estació 11 que a la estació 7. I així queda reflectit amb l'anàlisi de SIG a les Fig. 19, 22 i 24.

Totes aquestes incidències i variabilitats es veuen reflectides a les poblacions bacterianes que es detectaren en aquest treball, tant amb l'anàlisi dinàmica dels T-RFLP com amb l'estudi puntual de les genoteques. Així, es detectaven canvis importants de les comunitats bacterianes a través de la determinació dels índexs de diversitat, variacions que es manifestaven tant a l'espai com en el temps. Eren a les zones teòricament més eutrofitzades (port i platja) on s'obtenien els índexs de diversitat i d'uniformitat més elevats. Aquests resultats coincideixen amb estudis previs amb macroorganismes, els quals indiquen que la presència d'una pertorbació, sigui natural o artificial no necessàriament es tradueix amb una disminució local de diversitat (Sax and Gaines, 2003). De l'estudi de Port Adriano, cal destacar els elevats valors de diversitat del mes d'abril independentment de l'estació analitzada, degut a l'increment del nombre de T-RF observats. Aquesta proliferació de poblacions bacterianes al mes d'abril podria donar-se per l'augment de les temperatures i per la presència de

nutrients a les capes més superficials perquè encara no s'hauria format la termoclina estacional.

L'anàlisi de composició i estructura permetia detallar els canvis dins les comunitats bacterianes amb més precisió, revelant que les variacions es produïen de forma gradual i d'acord amb la localització de les estacions i la seva proximitat a les àrees d'impacte, port i platja. L'escala espacial de variació de les estacions de la badia (est. 5-11) encaixava amb els estudis previs de comunitats bacterianes del Mediterrani Occidental, on a escales petites (200 m a 9,3 km), no presentaven variacions espacials o aquestes eren insignificants (Ghiglione *et al.*, 2005). En canvi, sí que es detectaren importants diferències, a escales de metres, en la composició de les comunitats a les zones pròximes a les àrees d'impacte (port i platja). Un exemple seria entre les estacions 12 i 13 ó 13 i 14, les distàncies entre les quals no superaven els 200 m, i on es trobaven importants diferències entre les comunitats bacterianes. Així doncs, la presència de la platja i el port provocaven una forta influència en la composició bacteriana encara que restringida a una petita àrea veïnal. Un estudi interessant seria analitzar si les diferències espacials que es detectaren en aquest estudi en zones molt pròximes eren fruit de la presa de mostres en superfície i si aquestes diferències desapareixerien si l'estudi es realitzàs a alguns metres de profunditat (p.e. 5 m), com es fa habitualment en aquest tipus de treballs (Ghiglione *et al.*, 2005).

La comparació dels perfils de T-RFLP de les estacions 13 i 14, pròximes a la platja, denotaven la influència de l'ús de la costa sobre l'efecte de les comunitats. Així als mesos d'hivern, quan l'afluència de banyistes és pràcticament nul·la, els perfils de les estacions de la platja s'agrupaven amb els perfils obtinguts de les mostres de la badia (Fig. 30). De la mateixa manera es produïa una forta diferenciació amb els perfils d'hivern de la Platja de Palma en relació als perfils obtinguts als mesos de temporada turística alta (maig a octubre; Fig. 58). A més, a la genoteca d'hivern de la platja (est. 13) es produïa un increment del percentatge en abundància de clons majoritàriament detectats a l'estació de la badia (est. 5), com SAR11 i SAR86 (Fig. 41 i 43).

La identificació de les poblacions bacterianes observades a les mostres de la badia pertanyen a grups descrits anteriorment amb tècniques de clonació i seqüenciació a estudis d'ambients costaners (Rappé *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2003; Fuhrman *et al.*, 2006). Cal destacar l'absència de representants relacionats amb el grup marí d'*Actinobacteria* o de seqüències de *Beta-Proteobacteria*, observades sovint a ambients costaners (Rappé 1997, 2000).

Les poblacions bacterianes que es detectaven a les mostres de la badia (majoritàriament pertanyents al grup α -*Proteobacteria*) com eren SAR11, SAR116 i alguna població de *Roseobacter* a més de SAR86. Alguns d'aquests grups considerats oligotròfics estrictes (p.e. SAR11, Giovannoni *et al.*, 2005) desapareixien o disminuïen la seva abundància considerablement amb l'aproximació a les zones de la platja i del port. Aquest comportament permetria la utilització d'aquests bacteris com indicadors d'aigües que rebien un impacte baix, no només a les aigües de Port Adriano sinó també a les de la resta de l'illa de Mallorca, degut a que aquest comportament es produïa a tots els altres mostrejos analitzats. Potser que aquestes poblacions hagin respost a un increment de les concentracions de nutrients o a la presència de concentracions més elevades de substàncies tòxiques a les zones de la platja i del port. Aquesta hipòtesi es veu recolzada per la disminució en l'abundància a la zona de Port Adriano de la població de SAR11 representada pel T-RF A5-134,5, no només a les zones pròximes de la platja i el port, sinó també a les estacions més properes a la línia de costa. Altres indicis eren la correlació negativa de les dues poblacions més abundants de SAR11 (T-RF A5-134,5 i A5-172,2) amb les concentracions de clorofil·la a les zones de la platja i el port, a més de la relació negativa de SAR11 (T-RF A5-172,2) i una població de *Roseobacter* observada a la badia (T-RF A5-213,2) amb concentracions de compostos hidrofòbics a les mostres de la badia.

El grup SAR11 abasta entre un 25 i un 35% de la comunitat procariota de la superfície dels oceans i d'aigües costaneres (Morris *et al.*, 2002). Aquests microorganismes presenten característiques molt adients per a la vida al medi oligotròfic marí, sent un dels organismes de vida lliure més petits que s'han cultivat (Rappé *et al.*, 2002). Així augmenta l'eficiència en la captació de nutrients i afavoreix la competitivitat en aigües oligotròfiques (Simu i Hagstrom, 2004). Una altra de les característiques que afavoreix la competitivitat de les cèl·lules bacterianes en condicions baixes de nutrients que predomina als ambients marins, és la presència de proteorodopsina, que s'ha detectat a la soca HTCC1062 (*Candidatus Pelagibacter ubique*) membre cultivat de SAR11 (Giovannoni i Stingl, 2005).

El grup de SAR11 presenta una gran diversitat, s'han trobat entre les seqüències de 16S rRNA identitats tan baixes com 0,87 (Rappé i Giovannoni, 2003). L'anàlisi filogenètica de seqüències de SAR11 permet establir diferents subgrups, que es corresponen de forma general a diferents ecotips. Per exemple entre les seqüències detectades en medi marí es poden diferenciar les que provenen majoritàriament de mostres d'aigua superficial i d'aigua més profunda (Field *et al.*

1997; Rappé i Giovannoni, 2003). Entre les seqüències de 16S rDNA del grup SAR11 detectades en aquest estudi també es distingien filogenèticament dos grups (Fig. 42), amb diferent localització geogràfica. Les seqüències afiliades al grup relacionat amb *Candidatus Pelagibacter ubique* es localitzaven a les tres estacions analitzades (port, platja i badia), mentre que del segon grup totes menys una de les seqüències es trobaven a l'estació més allunyada de la costa (est. 5). Així doncs, el primer grup presentava una major diversificació espacial.

Les comunitats bacterianes a les àrees més influenciades per l'antropogenització, port i platja, eren diferents a les comunitats que es detectaren a la badia. Les poblacions de *Roseobacter* localitzades a la badia o a les àrees d'impacte eren diferents i augmentava l'abundància de forma important de poblacions pertanyents al grup γ -*Proteobacteria* i *Bacteroidetes*. Bacteris pertanyents al grup *Roseobacter* i al filum *Bacteroidetes* s'han trobat en enriquiments amb aigua de mar amb hidrocarburs (Chang *et al.*, 2000), mentre que el creixement de *Bacteroidetes* es va veure estimulat a un experiment de contaminació artificial en una platja amb cru de petroli (Macnaughton *et al.*, 1999).

En aquest estudi no es detectaren bacteris oligotròfics marins especialitzats en la degradació d'hidrocarburs (Head *et al.*, 2006) a les mostres de Port Adriano. Aquest tipus de bacteris sí es van detectar en estudis realitzats al port Victoria a Hong Kong i al port de Messina a Sicília (Zhang, 2007; Denaro *et al.*, 2005). En canvi, sí que es detectaren a la genoteca del port a l'hivern seqüències de 16S rDNA relacionades (amb un 97-98% d'identitat) amb *Acinetobacter schindleri* i altres seqüències obtingudes de reservoris de petroli a altes temperatures (Orphan *et al.*, 2000). Els bacteris pertanyents al gènere d'*Acinetobacter* s'han vist implicats en la degradació d'hidrocarburs en ambients marins (Radwan *et al.*, 1999) i per tant aquestes seqüències són les úniques representants d'aquest estudi que podien relacionar-se amb la contaminació per hidrocarburs al port. En canvi, no es detectaren altres seqüències relacionades amb ambients portuaris com *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Vibrio* o *Enterobacteriaceae*, que s'han detectat a Great South Bay i al port Victoria (Kelly i Chistoserdov, 2001; Zhang *et al.*, 2007). L'increment dels bacteris marins degradadors d'hidrocarburs s'han trobat a aigües contaminades després de l'enriquiment d'aquestes aigües amb nutrients, però aquests bacteris podrien ser indetectables abans del tractament (Head *et al.*, 2006). Els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que els bacteris degradadors d'hidrocarburs no constitueixen poblacions rellevants a les mostres d'aigua del port a la zona de Port

Adriano ni als altres Ports de Mallorca analitzats, però així i tot s'obtingueren aïllaments relacionats amb *Alcanivorax borkumensis* (Yakimov *et al.*, 1998) després de l'enriquiment d'un medi oligotròfic marí amb hidrocarburs alifàtics (dades no mostrades).

La predominança de certes poblacions de *Roseobacter*, *γ -Proteobacteria* i *Bacteroidetes* a la zona de la platja i del port podria també està relacionada amb l'increment de la concentració de nutrients. Així doncs, la presència de més partícules, un major temps de residència de les aigües a dins el port i la presència de fitoplàncton eucariota (evidenciat per les altes concentracions de clorofil·la obtingudes i la detecció de T-RF i clons associats a algues *Prasinophyceae*) són factors que s'han relacionat amb la presència d'aquest bacteris (Schäfer *et al.*, 2000; Kirchman, 2002; Pinhassi *et al.*, 2004; 2005; Buchan *et al.*, 2005). Per exemple, l'abundància de dues poblacions bacterianes (T-RF Cfo I 5' 61,3 del grup *Bacteroidetes* i T-RF Cfo I 5' 320,2 del grup OM60 pertanyent a *γ -Proteobacteria*) a les mostres de la platja i el port correlacionaven positivament amb les concentracions de clorofil·la i aquests tipus de microorganismes s'han relacionat amb proliferacions massives de fitoplàncton (Pinhassi *et al.*, 2004; 2005).

A l'igual que en altres estudis, la majoria de seqüències obtingudes en aquest treball pertanyents a *Bacteroidetes* van ser relacionades amb seqüències de 16S rDNA de bacteris no cultivats (Fig. 44). Tant les seqüències relacionades amb el grup *agg58* (De Long *et al.*, 1993; O'Sullivan *et al.*, 2004) com les relacionades amb la família *Cryomorphaceae* únicament van ser observades a la genoteca de la platja. No es coneix el per què d'aquest comportament de les citades poblacions de *Bacteroidetes* en aquests ambients, però podria ser que les condicions particulars de la platja afavoreixen la presència d'aquests dos grups filogenètics. Les seqüències obtingudes en aquest estudi s'associaven principalment amb grups descrits prèviament a German Bight, a l'estuari Delaware i a la costa de Plymouth (Alonso *et al.*, 2007, Kirchman *et al.*, 2003 i O'Sullivan *et al.*, 2004). S'observà també un nou grup de seqüències formades pels clons MAW17, MAW77 i BES26, que presentaven una elevada similitud amb seqüències parcials de bandes de DGGE aparegudes a perfils de microcosmos procedents del nord-oest del mar Mediterrani (Pinhassi *et al.*, 2004) i amb una seqüència detectada a una llacuna hipersalina en el projecte Global Ocean Survey (Rusch *et al.*, 2007).

També cal destacar la composició inusual que presentava la genoteca del port a l'estiu respecte al comportament de les altres genoteques, propiciada principalment

per la predominança de seqüències pertanyents a un grup d'*Actinobacteria* d'origen no marí, que reemplaçava totalment la presència de les seqüències pertanyents a α -*Proteobacteria* com a grup principal (també es detectaren, encara que amb menor abundància a la genoteca de la platja també a l'estiu). Aquest grup es relacionava amb grups característics d'ambients d'aigua dolça. Aquest mateix resultat s'obtingué a l'estudi realitzat a Great South Bay, on la presència d'*Actinobacteria* d'origen no marí era atribuït a aportacions d'aigua terrestre (Kelly i Chistoserdov, 2001). Així i tot, no es pot demostrar que la presència d'aquest grup fos d'origen al·lòcton, o si la seva proliferació era la resposta a unes condicions ambientals particulars i/o a la presència de certes fonts de carboni al port en aquell moment. L'anàlisi dels perfils de T-RFLP confirmava la presència d'aquest grup únicament al mes d'agost a les estacions del port. Això podria indicar que la genoteca d'estiu del port no representa la composició habitual de les comunitats bacterianes en aquesta zona. Tot i així, els resultats obtinguts demostren clarament que en un ambient tancat com el del port, podrien donar-se modificacions dràstiques en la composició de la comunitat, provocant que un bacteri d'origen no marí predomini en abundància desplaçant grups marins, almenys transitòriament.

Les comunitats bacterianes a la zona de Port Adriano presentaven també una important variabilitat a escala temporal, a l'igual que s'ha descrit a altres indrets (Schauer *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Fuhrman *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2007). Aquestes variacions estan relacionades amb factors ambientals (Brown *et al.*, 2005; Fuhrman *et al.*, 2006). A les zones de mostreig les característiques oligotròfiques de la mar i l'estratificació de la columna d'aigua a causa de la formació de la termoclina des del final de la primavera fins a la tardor, provoca una limitació de nutrients a les capes més superficials de l'aigua (Duarte *et al.*, 1999; Sala *et al.*, 2002). Els efectes de les tempestes de final d'estiu i la mescla de les capes de l'aigua que es produeix a l'hivern provoca el retorn de nutrients a les capes més superficials i facilita un ràpid creixement fitoplanctònic a principis de la tardor i final de l'hivern (Duarte *et al.*, 1999). D'acord amb aquests canvis la majoria de les poblacions bacterianes predominants en mostres de la badia en aquest estudi presenten una correlació significativa amb la temperatura (Taula 4), i s'observava a la tardor i a l'hivern l'increment de la concentració de clorofil·la i de l'abundància de la població de *Synechococcus* a les mostres de la badia. A més s'observava que poblacions d'un mateix grup filogenètic, com per exemple dins SAR11, *Roseobacter* o SAR86, presentaven dinàmiques diferents en relació amb la temperatura. Així doncs, aquestes

poblacions podrien tenir capacitat metabòliques diferents que permetien la seva proliferació amb diferents condicions ambientals. Per una altra banda, els ecosistemes a les àrees més antropogenitzades no presentaven aquestes característiques, ja que el màxim concentració de clorofil·la es detectava a l'estiu. En aquestes zones d'impacte (Fig. 31) les comunitats bacterianes eren molt més variables i els patrons de variacions temporals en l'abundància de les poblacions era molt més irregular i menys relacionats amb la temperatura (Taula 4).

Les comunitats bacterianes analitzades a altres indrets de l'illa de Mallorca permeteren una comparació amb l'estudi principal de Port Adriano. No totes les poblacions detectades al Port de Palma coincidien amb les que es trobaren a Port Adriano, però si cal destacar que les poblacions majoritàries eren coincidents a ambdues àrees estudiades. Entre aquestes poblacions es trobaven les de *Roseobacter* A5-211,1 i A5-213,4, la dinàmica temporal de les quals era la mateixa que presentaven a Port Adriano. La població de A5-211,1 augmentava en abundància als mesos de més calor i la població identificada amb A5-213,3 disminuïa la seva abundància al juny. La població de SAR11 identificada al Port de Palma, igualment presentava un comportament semblant a Port Adriano, augmentant la seva abundància amb la distància a la costa.

A l'estudi realitzat a diversos ports de l'illa de Mallorca es detectà majoritàriament la població de *Roseobacter* identificada amb el fragment A5-213,5. A pesar de les grans diferències morfològiques i dinàmiques que presentaven entre ells els diferents ports, la presència d'aquesta població era patent en tots ells. En canvi no es detectà la població de *Roseobacter* A5-211 identificada a altres mostres, molt probablement degut a que el mostreig dels ports tan sols es realitzà al mes de gener, i aquesta població es detectava abundantment als mesos d'estiu. També es detectaren poblacions de *Bacteroidetes*, a l'igual que als altres ports analitzats. La presència de SAR11 va ser puntual a un sol port (Colònia de Sant Pere) amb baixa abundància, tal i com s'esperava.

Finalment les comunitats microbianes de la Platja de Palma no presentaven grans similituds amb la platja de Port Adriano, però si que es trobaven les mateixes poblacions majoritàries en totes dues platges. Principalment les poblacions de *Roseobacter* i *Bacteroidetes*, que presentaven a més, un comportament temporal molt semblant.

En general, les principals poblacions detectades es trobaren a tots els mostrejos analitzats amb un mateix comportament temporal i espacial, aquest darrer en relació a l'afectació de la costa sobre les comunitats bacterianes.

Així doncs, en aquest estudi queden reflectits canvis importants en les poblacions bacterianes al llarg del temps i de l'espai, a l'igual que variacions en diferents paràmetres químics, físics i biològics determinats. Es confirma la repercussió de la costa i de les activitats recreatives allí realitzades a l'àmbit microbià. I finalment, l'aplicació dels Sistemes d'Informació Geogràfica a més de facilitar l'estudi proporciona una eina per a una futura gestió integradora del sistema litoral.

CONCLUSIONS

1. La zona de Port Adriano presentava una variació gradual dels diferents paràmetres analitzats: clorofil·la, compostos hidrofòbics, nombre de cèl·lules i percentatge de cèl·lules actives que denotava la influència de la presència del port esportiu, disminuint els valors per aquests paràmetres en augmentar la distància a les zones d'impacte, port i platja. La interpolació de les dades georeferenciades utilitzant eines de Sistemes d'Informació Geogràfica (SIG) va permetre definir dos hàbitats diferents: badia i port (amb nivells baixos i alts d'impacte respectivament) i una zona de transició entre ells.
2. A l'igual que els paràmetres abans esmentats, les comunitats bacterianes a la zona de Port Adriano diferien principalment d'acord amb la seva localització espacial. A un segon nivell les comunitats es diferenciaven pel factor temporal. Els canvis espacials detectats es produïen gradualment i a escales curtes (200 m) i a la zona de la platja s'evidenciava l'efecte de l'ús de la costa en les comunitats bacterianes. Les comunitats de zones impactades tenien una major diversitat i dinàmiques temporals més irregulars.
3. Les poblacions predominants a les àrees d'impacte a Port Adriano disminuïen la seva abundància de manera gradual quan augmentava la distància a les zones d'impacte, com poblacions del grup de *Roseobacter*, de *γ-Proteobacteria* i *Bacteroidetes*. En canvi, poblacions característiques d'aigües oligotròfiques com SAR11 disminuïen la seva presència amb l'aproximació al port fins a no detectar-se al seu interior.
4. Malgrat que les comunitats bacterianes presents en d'altres zones analitzades (Platja de Palma i diferents ports esportius de l'illa de Mallorca) eren diferents, totes elles presentaven característiques comuns com: (1) tenir com a poblacions predominants membres del grup *Roseobacter* i *Bacteroidetes* (identificades per T-RF característics), i (2) la disminució de l'abundància de SAR11. Aquestes variacions podrien permetre la utilització d'aquestes poblacions com a bioindicadors d'aigües costaneres que presenten impacte antropogènic.

5. La representació de les variacions poblacionals bacterianes mitjançant Sistemes d'Informació Geogràfica permet una ràpida anàlisi visual i quantitativa dels resultats sobre la geografia estudiada i es podria considerar com una bona eina de gestió del litoral per conèixer l'abast dels impactes costaners.

BIBLIOGRAFIA

- Acinas, S.G., Rodríguez-Valera, F. i Pedrós-Alio, C. (1997) Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 27–40.
- Agustí, S., i Duarte, C.M. (2000) Strong seasonality in phytoplankton cells lysis in the NW Mediterranean littoral. *Limnol. Oceanogr.* 45: 940–947.
- Alonso, C., Warnake, F., Amman, R. i Pernthaler, J. (2007) High local and global diversity of *Flavobacteria* in marine plankton. *Environ. Microbiol.* 9: 1253–1266.
- Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sà, E.L., Sánchez, O., González, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedrós-Alió, C. i Gasol, J.M. (2007) Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60: 98–112.
- Amann, R., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S. W., Devereux, R. i Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919–1925.
- Azam, F. i Hodson, R.E. (1977) Size distribution and activity of marine microheterotrophs. *Limnol. Oceanogr.* 22:492–501.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. i Thingstad, F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257–263.
- Basterretxea, G., Garcés, E., Jordi, A., Masó, M. i Tintoré, J. (2005) Breeze conditions as a favoring mechanism of *Alexandrium taylori* blooms at a Mediterranean beach. *Estuar. Coast. Shelf S.* 62: 1–12.
- Béthoux, J.P., P. Morin i Ruiz-Pino, D.P. (2002) Temporal trends in nutrient ratios: chemical evidence of Mediterranean ecosystem changes driven by human activity. *Deep-Sea Res. II.* 49: 2007–2016.

- Bird, D.F. i Kalff, J. (1984) Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 41: 1015–1023.
- Bosque Sendra, J. (2000) “Sistemas de Información Geográfica”. Madrid: RIALP.
- Brown, M.V., Schwalbach, M.S., Hewson, I. i Fuhrman, J.A. (2005) Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. *Environ. Microbiol.* 7: 1466–1479.
- Buchan, A., Gonzalez, J.M. i Moran, M.A. (2005) Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5665–5677.
- Burrough, P. (1988) “Principles of Geographical Information Systems for land resources assessment”. Oxford: Oxford University Press, pp.220.
- Carlson, C., Ducklow, H. i Michaels, A. (1994) Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the Sargasso sea. *Nature* 371: 405–408.
- Caron, D.A. (2005) Marine microbial ecology in a molecular world: what does the future hold? *Scientia Marina* 69: 97–110.
- Chang, Y-J., Stephen, J.R., Richter, A.P., Venosa, A.D., Bruggeman, J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Haines, J.R., Kline, E. i White, D.C. (2000) Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. *J. Microbiol. Methods* 40: 19–31.
- Chatila, K., Demers, S., Mostajir, B., Gosselin, M., Chanut, J.-P., Monfort, P. i and Bird, D. (2001) The responses of a natural bacterioplankton community to different levels of ultraviolet-b radiation: a food web perspective. *Microb. Ecol.* 41: 56–68.

- Cho, J.-C. i Giovannoni, S.J. (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 432–440.
- Cloern, J.E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210: 223–253.
- Cognetti, G., Sarà, M. i Magazzù, G. (2001) “Biologia marina”. Bologna, Italia: Ariel Ciencia, pp. 606.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, D., McGarrell, M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M. i Tiedje, J.M. (2003) The ribosomal database project (RDP-II): previewing a new autoligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31: 442–443.
- Cochrane, G., Akhtar, R., Aldebert, P., Althorpe, N., Baldwin, A., Bates, K., Bhattacharyya S., Bonfield, J., Bower, L., Browne, P., Castro, M., Cox, T., Demiralp, F., Eberhardt, R., Faruque, N., Hoad, G., Jang, M., Kulikova, T., Labarga, A., Leinonen, R., Leonard, S., Lin, Q., Lopez, R., Lorenc, D., McWilliam, H., Mukherjee, G., Nardone, F., Plaister, S., Robinson, S., Sobhany, S., Vaughan, R., Wu, D., Zhu, W., Apweiler, R., Hubbard, T. i Birney, E. (2008) Priorities for nucleotide trace, sequence and annotation data capture at the Ensembl Trace Archive and the EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res* 34: D10–D15.
- De Long, E.F., Franks, D.G. i Alldredge, A.L. (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* 38: 924–934.
- Denaro, R., D’Auria, G., Di Marco, G., Genovese, M., Troussellier, M., Yakimov, M.M. i Giuliano, L. (2005) Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. *Environ. Microbiol.* 7:78–87.

- Dobson, M. i Frid C.L. (1998) "Ecology of Aquatic Systems". Essex, England: Longman, pp. 368.
- Duarte, C.M., Agustí, S., Kennedy, H. i Vaque, D. (1999) The Mediterranean climate as a template for Mediterranean marine ecosystems: the example of the Northeast Spanish littoral. *Prog. Oceanogr.* 44: 245–270.
- Ducklow, H. (2000) Bacterial production and Biomass in the oceans. In "Microbial ecology of the oceans". Kirchman, D.L. (ed). Wiley-Liss: New York:, pp. 85–120.
- Estrada, M., Varela, R., Salat, J., Cruzado, A. i Arias, E. (1999) Spatio-temporal variability of the winter phytoplankton distribution across the Catalan and North Balearic fronts (NW Mediterranean). *J. Plankton Res.* 21: 1–20.
- Fahy, A., Lethbridge, G., Earle, R., Ball, A.S., Timmis, K.N. i McGenity, T.J. (2005) Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environ. Microbiol.* 7: 1192–1199.
- Field, K., Gordon, D., Wright, T., Rappé, M., Urback, E., Vergin, K. i Giovannoni, S. (1997) Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 63–70.
- Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V. i Naeem, S. (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 13104–13109.
- Ghiglione, J-F., Larcher, M. i Lebaron, P. (2005) Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 40: 229–240.
- Giovannoni, S.J., Tripp, H.J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K.L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T.H., Noordewier, M., Rappé, M.S., Short, J.M., Carrington, J.C. i Mathur, E.J. (2005) Genoma streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* 309:1242–1245.

- Giovannoni, S.J. i Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437: 343–348.
- Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. i Schleifer, K.H. (1996) An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 403–406.
- Good, I.L. (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40: 237–264.
- Gotelli, N.J. i Colwell, R.K. (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol. Lett.* 4: 379–391.
- Hahn, M.W., Stadler, P., Wu, Q.L. i Pockl, M. (2004) The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 57: 379–390.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. i Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeo. Electronica* 4: 9pp.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. i Moore, E.R.B. (1997) Comparison of 16S Ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 328–335.
- Head, I.M., Jones, D.M. i Roling, W.F.M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 173–182.
- Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A. i Moffett, B.F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 1–11.
- Islam, S. i Tanaka, M. (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 624–649.

- Jeffrey, S.W. i Humprey, G.F. (1975) New spectrophotometric equation for determining chlorophyll a, b, c1 i c2. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 194–204.
- Jukes, T.M. i Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In “Mammalian protein metabolism”. Munr, H.M. (ed). New York, N.Y.: Academic Press, pp. 21–132.
- Kelly, K.M. i Chistoserdov, A.Y. (2001) Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island). *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 85–95.
- Kelsey, H., Porter, D.E., Scott, G., Neet, M. i White, D. (2004) Using Geographic Information Systems and regresion analysis to ealuate relationships between land use and fecal coliform bacterial pollution. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298: 197–209.
- Keough, M.J. i Black, K.P. (1996) Predicting the scale of marine impacts. In “Detecting ecological impacts: concepts and applications in coastal habitats”. Schmitt, R.J. and Osenberg, C.W. (eds.) San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 19–234.
- Kirchman, D.L. (2002) The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 91–100.
- Kirchman, D.L., Yu, L. i Cottrell, M.T. (2003) Diversity and abundance of uncultured *Cytophaga*-like bacteria in the Delaware estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6587–6596.
- Kitsiou, D. i Karydis, M. (2000) Categorical mapping of marine eutrophication based on ecological indices. *Sci. Total Environ.* 255: 113–127.
- Krom, M.D., Kress, N. i Brenner S. (1991) Phosphorus limitation of primary productivity in the Eastern Mediterranean sea. *Limnol. Oceanogr.* 36: 424–432.
- Lalli, C.M., i Parsons, T.R. (2000) “Biological oceanography: an introduction”. Oxford: Butterworth Heinemann, pp. 320.

- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing primers. In "Nucleic acid techniques in bacterial systematics". Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd., pp. 132–137.
- Lau, S.C., Tsoi, m.M., Li, X., Plakhotnikova, I., Dobretsov, S., Lau, K.W., Wu, M., Wong, P.K. Pawlik, J.R. i Quian, P.Y. (2005) *Winogradskyella poriferorum* sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from a sponge in the Bahamas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1589–1592.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. i Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment lenght polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516–4522.
- Lipiatou, E., Tolosa, I., Simó, R., Bouloubassi, I., Dachs, J., Marti, S. Sicre, M-A, Bayona, J.M., Grimalt, J.O., Saliot, A., Albaiges, J. (1997) Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean sea. *Deep Sea Res. II* 44: 881–905.
- Lloyd, M. i Ghelardi, R.J. (1964) A table for calculating the "equitability" component of species diversity. *J. Anim. Ecol.* 33: 217–255.
- Lucea, A., Duarte, C.M., Agustí, S. i Sondergaard, M. (2003) Nutrient (N, P and Si) and carbon partitioning in the stratified NW Mediterranean. *J. Sea Res.* 49: 157–170.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. i Schleifer, K-H (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363–1371.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y-J. i White, D.C. (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3566–3574.

- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. i Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795–799.
- Morris, R.M., M.S. Rappé, Connon, S.A., Vergin, K., Siebold, W.A., Carlson, C. i Giovannoni, S.J. (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420: 806–810.
- Mou, X., Hodson, R.E. i Moran, M.A. (2007) Bacterioplankton assemblages transforming dissolved organic components in coastal seawater. *Microb. Ecol.* 9: 2025–2037.
- Mullins, T.M., Britschgi T.B., Krest, R.L. i Giovannoni, S.J. (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 40: 148–158.
- Nagata, T. (2000) Production mechanisms of dissolved organic material. In “Microbial ecology of the oceans”. Kirchman, D.L. (ed). Wiley-Liss: New York, pp. 121–152.
- Navarro, N., Agustí, S. i Duarte, C.M. (2004) Plankton metabolism and dissolved organic carbon use in the Bay of Palma, NW Mediterranean sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 37: 47–54.
- Nogales, B., Moore, E.R.B., Abraham, W.-R. i Timmis, K.N. (1999) Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ. Microbiol.* 1: 199–212.
- Nybakken (1997) “Marine Biology: an Ecological Approach”. Benjamin Cummings (ed.) Addison-Wesley: New York.
- Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, T. i De Long, E.F. (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 700–711.

- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. i Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2: 39–50.
- O'Sullivan, L.A., Fuller, K.E., Thomas, E.M., Turley, C.M., Fry, J.C. i Weightman, A.J. (2004) Distribution and culturability of the uncultivated 'AGG58 cluster' of the *Bacteroidetes* phylum in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 359–370.
- Pearson, W.R. i Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444–2448.
- Pérez, S., Dachs, J. i Barceló, D. (2003) Sea breeze modulated volatilization of polycyclic aromatic hydrocarbons from the Masnou Harbor (NW Mediterranean Sea). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3794–3802.
- Pinhassi, J. i Hagstrom, A. (2000) Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21: 245–256.
- Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O., Malits, A. i Marrasé, C. (2004) Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6753–6766.
- Pinhassi, J., Simó, R., González, J.M., Vila, M., Alonso-Sáez, L., Kiene, R.P., Moran, M.A., Pedrós-Alió, C. (2005) Dimethylsulfoniopropionate turnover is linked to the composition and dynamics of the bacterioplankton assemblage during a microcosm phytoplankton bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7650–7660.
- Porter, K.G. i Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943–938.
- Puigserver, M., Ramón, G., Moyà, G. i Martínez-Taberner, A. (2002) Planktonic chlorophyll a and eutrophication in the two Mediterranean littoral systems (Mallorca Island, Spain). *Hydrobiologia* 475/476: 493–504.

- Radwan, S., Al-Hasan, R.H., Al-Awadhi, H., Salamah, S. i Abdullah, H.M. (1999) Higher oil biodegradation potential at the Arabian Gulf coast than in the water body. *Mar. Biol.* 135: 741–745.
- Rappé, M., P.F. Kemp i S.J. Giovannoni (1997) Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol. Oceanogr.* 42: 811–826.
- Rappé, M.S., Vergin, K. i Giovannoni, S.J. (2000) Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 219–232.
- Rappé, M., Connon, S.A., Vergin, K.L. i Giovannoni, S.J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418: 630–633.
- Rappé, M.S. i Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369–394.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y. H., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Nealson, R., Friedman, R., Frazier, M. i Venter, J.C.(2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: North-west Atlantic through Eastern tropical Pacific. *PLOS Biol.* 5: 398–431.
- Saitou, N. i Nei, M. (1987) The Neighbor-joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Sambrook J. and Russell, D.W. (2001) “Molecular cloning, a laboratory manual”, vol.1. CSHL Press, New York.

- Sala, M.M., Peters, F., Gasol, J.M., Pedrós-Alió, C., Marrasé, C. i Vaqué, D. (2002) Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the Northwestern Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 27: 47–56.
- Sax, D.F. i Gaines, S.D. (2003) Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends Ecol. Evol.* 18: 561–566.
- Schäfer, H., Servais, P. i Muyzer, G. (2000) Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement. *Arch. Microbiol.* 173: 138–145.
- Schauer, M., Massana, R. i Pedrós-Alió, C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 51–59.
- Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. i Massana, R. (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* 31: 163–174.
- Schloss, P.D., Larget, B.R. i Handelsman, J. (2004) Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5485–5492.
- Shannon, C.E. (1948) The mathematical theory of communication. *Bel Systems Tech. J.* 27: 379–423.
- Shepard, D. (1968) A two-dimensional interpolation function for irregularly-spaced data. In 23rd AMC National Conference. New York, USA: ACM Press, pp. 517–524.
- Simu, K. i Hagstrom, A. (2004) Oligotrophic bacterioplankton with a novel single-cell life strategy. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2445–2451.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L. i Whitman, W.B. (2001) Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4374–4376.

- Smith C.J., Danilowicz, B.S., Clear, A.K., Costello, F.J., Wilson, B. i Meijer, W.G. (2005) T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment lenght polymorphism profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 375–380.
- Sneath, P.H. i Sokal, R.R. (1962) Numerical Taxonomy. *Nature* 193: 855–860.
- Stoner, D.L., Geary, M.C., White, L.J., Lee, R.D., Brizee, J.A., Rodman, A.C. i Rope, R.C. (2001) Mapping microbial biodiversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4324–4328.
- Turley, C.M. (1999) The changing Mediterranean Sea: a sensitive ecosystem? *Prog. Oceanogr.* 44: 387–400.
- Warnecke, F., Amann, R. i Pernthaler, J. (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* 6: 242–253.
- White, D.L., Porter, D.E. i Lewitus, A.J. (2004) Spatial and temporal analyses of water quality and phytoplankton biomass in an urbanized versus a relatively pristine salt marsh estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298: 255–273.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W-R, Lüsdrof, H. and Timmis, K.N. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 339–348.
- Zhang, R., Liu, B., Lau S.C.K., Ki, J.S. i Quian, P.Y. (2007). Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 496–508.